

## 明細書

## ヒト化抗CD47抗体

## 技術分野

[0001] 本発明は、CD47に結合するヒト化抗体に関する。当該ヒト化抗CD47抗体は、白血病等の血液疾患の治療薬として有用である。

## 背景技術

[0002] CD47はIntegrin Associated Protein(IAP)とも呼ばれる膜タンパク質である。インテグリンは細胞と細胞外マトリックス及び細胞一細胞間の接着を司る接着分子の1つであり、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の異なる2つのサブユニットよりヘテロダイマーを構成する。近年、インテグリン関連分子として、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンと複合体を形成するCD47(IAP)が注目されており、これに対する抗体の医薬用途も研究されている。

[0003] WO97/32601は、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、抗原としてマウスCD47を認識する新規モノクローナル抗体の取得を記載している。また、WO97/32601は、前記モノクローナル抗体が骨髄系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有することを開示している。

[0004] WO99/12973は、ヒトのCD47(以下ヒトCD47とする;J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993にアミノ酸配列及び塩基配列が記載;Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 1995)を抗原とするモノクローナル抗体であって、当該ヒトCD47を有する有核血液細胞(骨髄系細胞及びリンパ球)にアポトーシスを誘起させる特性を有するモノクローナルMABL-1抗体、MABL-2抗体、これを產生するハイブリドーマ、MABL-1(FERM BP-6100)及びMABL-2(FERM BP-6101)を記載している。

[0005] WO02/33072、WO02/33073は、ヒトCD47を抗原とするモノクローナル抗体から、ヒトCD47を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する一本鎖のFv領域を有する一本鎖Fvを得たことを開示している。

[0006] しかしながら、ヒトCD47を抗原とするモノクローナル抗体を治療薬として用いる場合、抗原性を低下させ、なおかつCD47への結合活性及びアポトーシス誘起活性を維

持させる必要がある。

特許文献1: WO97/32601

特許文献2: WO99/12973

特許文献3: WO02/33072, WO02/33073

非特許文献1: J. Cell Biol., 123, 485–496, 1993

非特許文献2: Journal of Cell Science, 108, 3419–3425, 1995

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、抗原性が低下したヒト化抗CD47抗体を提供することである。また、本発明の他の課題は、前記得られたヒト化抗CD47抗体の低分子化抗体を提供することである。さらに、本発明の課題は前記得られた低分子ヒト化抗体を安定化させた抗体を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、抗原性が低下し、かつCD47への結合活性及びアポトーシス誘起活性が維持されており、従って血液疾患治療薬として有用なヒト化抗CD47抗体を見いだした。

[0009] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

[1] CD47に結合するヒト化抗体。

[2] CD47がヒトCD47である前記[1]に記載のヒト化抗体。

[3] ヒト化抗体のCDRがマウス抗体由来である前記[1]または[2]に記載のヒト化抗体。

[4] 以下の配列のいずれかを含む前記[1]～[3]のいずれかに記載のヒト化抗体:

(1) 配列番号7のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(2) 配列番号10のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(3) 配列番号13のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(4) 配列番号16のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(

CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(5)配列番号19のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(6)配列番号22のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(7)配列番号30のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(8)配列番号37のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(9)配列番号40のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(10)配列番号43のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(11)配列番号46のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(12)配列番号49のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(13)配列番号52のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(14)配列番号57のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(15)配列番号64のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(16)配列番号67のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)。

[5] 以下の配列のいずれかを含む前記[1]～[3]のいずれかに記載のヒト化抗体:

(1)配列番号7のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

- (2)配列番号10のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (3)配列番号13のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (4)配列番号16のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (5)配列番号19のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (6)配列番号22のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (7)配列番号30のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (8)配列番号37のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (9)配列番号40のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (10)配列番号43のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (11)配列番号46のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (12)配列番号49のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (13)配列番号52のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (14)配列番号57のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (15)配列番号64のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(16)配列番号67のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)。

[6] 低分子化抗体である前記[1]～[5]のいずれかに記載のヒト化抗体。

[7] ダイアボディ(Diabody)である請前記[6]記載のヒト化抗体。

[8] 一本鎖Diabodyである前記[7]記載のヒト化抗体。

[9] Diabodyを構成するフラグメント間にジスルフィド結合が存在することを特徴とする前記[7]または[8]に記載のヒト化抗体。

[10] 以下の特徴を有する前記[9]記載のヒト化抗体:

(1)配列番号90に記載のアミノ酸配列を有する抗体;又は

(2)アミノ酸配列(1)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換したアミノ酸配列を有し、かつCD47への結合活性を有する抗体。

[11] 以下の特徴を有する前記[9]記載のヒト化抗体:

(1)配列番号92に記載のアミノ酸配列を有する抗体;又は

(2)アミノ酸配列(1)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換したアミノ酸配列を有し、かつCD47への結合活性を有する抗体。

[12] Diabodyを構成するフラグメント間にジスルフィド結合が存在することを特徴とする、ヒトCD47に結合するDiabody抗体。

[13] 以下の配列のいずれかを含む前記[12]に記載のDiabody抗体:

(1)配列番号7のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(2)配列番号10のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(3)配列番号13のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(4)配列番号16のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(5)配列番号19のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

- (6)配列番号22のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (7)配列番号30のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (8)配列番号37のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (9)配列番号40のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (10)配列番号43のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (11)配列番号46のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (12)配列番号49のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (13)配列番号52のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (14)配列番号57のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (15)配列番号64のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (16)配列番号67のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)。

[14] 以下の配列を含むCD47に結合するヒト化抗体:

- (1)配列番号30のアミノ酸番号1～117の配列の配列を含むH鎖V領域:及び
- (2)配列番号57のアミノ酸番号1～112の配列の配列を含むL鎖V領域。

[15] 以下の配列を含むCD47に結合するヒト化抗体:

- (1)配列番号64のアミノ酸番号1～117の配列を含むH鎖V領域:及び
- (2)配列番号67のアミノ酸番号1～112の配列を含むL鎖V領域。

[16] 以下のいずれかの配列を含むCD47に結合する抗体:

- (1) 配列番号73のアミノ酸番号1ー234の配列
- (2) 配列番号74のアミノ酸番号1ー234の配列
- (3) 配列番号78のアミノ酸番号1ー483の配列
- (4) 配列番号79のアミノ酸番号1ー483の配列。

[17] 前記[1]～[16]のいずれかに記載の抗体をコードする遺伝子。

[18] 前記[17]に記載の遺伝子を含むベクター。

[19] 前記[18]に記載のベクターを含む宿主細胞。

[20] 前記[19]に記載の宿主細胞を培養する工程を含む抗体の製造方法。

[21] 前記[1]～[16]のいずれかに記載の抗体を含む血液疾患治療薬。

[22] 血液疾患が急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髓腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫(Hodgkin病、非Hodgkinリンパ腫)、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群、及び真性多血症から選択される前記[21]記載の治療薬。

#### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、ヒト化H鎖バージョン1.1、1.2、1.3とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体と同程度のヒトIAP結合活性を有することを示すグラフである。

[図2]図2は、ヒト化H鎖バージョン1.1、1.2、1.3とキメラL鎖を組み合わせた抗体はMABL-2による結合阻害活性ではバージョン1.2、1.3はキメラ抗体とほぼ同等の阻害活性を有することを示すグラフである。

[図3]図3は、ヒト化H鎖バージョン1.4、1.5とキメラL鎖を組み合わせた抗体の結合活性はキメラ抗体およびバージョン1.3と同等であることを示すグラフである。

[図4]図4は、ヒト化H鎖バージョン1.4、1.5とキメラL鎖を組み合わせた抗体の結合阻害活性はキメラ抗体およびバージョン1.3より弱いことを示すグラフである。

[図5]図5は、ヒト化H鎖バージョン2.1はキメラ抗体とほぼ同等のMABL-2による結合阻害活性を有することを示すグラフである。

[図6]図6は、ヒト化L鎖バージョン1.1、1.2、1.3とキメラH鎖を組み合わせた抗体は三種ともキメラ抗体より弱いヒトIAPに対する結合活性を示すグラフである。

[図7]図7は、ヒト化L鎖バージョン1.1、1.2、1.3とキメラH鎖を組み合わせた抗体はMABL-2による結合阻害活性ではいずれもキメラ抗体に比べて弱いことを示すグラフである。

[図8]図8は、ヒト化L鎖バージョン1.4、1.5とキメラH鎖を組み合わせた抗体のうちバージョン1.4はキメラ抗体と同様な結合活性を有することを示すグラフである。

[図9]図9は、ヒト化L鎖バージョン1.4、1.5とキメラH鎖を組み合わせた抗体のうちバージョン1.4は結合阻害活性についてもキメラ抗体に近づいたことを示すグラフである。

[図10]図10は、ヒト化L鎖バージョン2.1とキメラH鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体と同程度のMABL-2による結合阻害活性を有することを示すグラフである。

[図11]図11は、ヒト化H鎖バージョン2.1とヒト化L鎖バージョン2.1を組み合わせたヒト化MABL-2抗体は、キメラ抗体と同程度のMABL-2による結合阻害活性を有することを示すグラフである。

[図12]図12は、ヒト化H鎖バージョン2.1とヒト化L鎖バージョン2.1を組み合わせたヒト化MABL-1抗体は、キメラ抗体と同程度のMABL-1による結合阻害活性を有することを示すグラフである。

[図13]図13Aは、ヒト化MABL-1抗体、図13Bは、ヒト化MABL-2抗体がヒトIAP遺伝子を導入したL1210細胞に細胞死を誘導することを示すグラフである。

[図14]図14は、ヒト化MABL-1抗体HL5産生CHO細胞の培養上清をSP-Sepharose F.F. columnにより精製した際のクロマトグラムである。網目をかけた部分は精製画分として次工程で使用したことを示す。

[図15]図15は、ヒト化MABL-1抗体HL5の精製過程において、SP-Sepharose F.F. columnで得られた画分をHydroxyapatite columnにより精製した際のクロマトグラムである。網目をかけた部分は精製画分として次工程で使用したことを示す。

[図16]図16は、ヒト化MABL-1抗体HL5の精製過程において、Hydroxyapatite columnで得られた画分をSuperdex200 columnにより精製した際のクロマトグラムである。網目をかけた部分を最終精製標品と回収したことを示す。

[図17]図17は、精製した4種類のヒト化MABL-1抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>、ヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>の、Superdex 200 columnにより分析ゲルろ過の結果

を示す。いずれもシングルピークで、ヒト化MABL-1抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>は見かけ上の分子量は約42 kDaを、ヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>は、見かけ上の分子量約40 kDaを示した。

[図18]図18は、精製したヒト化MABL-1抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>の還元と非還元条件SDS-PAGE分析の結果を示す。HL5は両条件ともmonomerの分子量位置(約30 kDa)に単一のバンドを示し、sc(Fv)<sub>2</sub>は両条件ともmonomerの分子量位置(約55 kDa)に単一のバンドを示した。

[図19]図19は、精製したヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>の還元と非還元条件SDS-PAGE分析の結果を示す。HL5は両条件ともmonomerの分子量位置(約30 kDa)に単一のバンドを示し、sc(Fv)<sub>2</sub>は両条件ともmonomerの分子量位置(約55 kDa)に単一のバンドを示した。

[図20]図20は、ヒト化MABL-2抗体HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>、ヒト化MABL-1抗体HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>がMOLT4細胞に細胞死を誘導することを示すグラフである。

[図21]図21は、ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2がヒト白血病マウスモデルにおいて、延命効果を有することを示した図である。

[図22]図22は、S-S結合導入ヒト化MABL-2 HL5の作製を示す模式図である。

[図23]図23は、精製したヒト化MABL-2抗体HL5 SS44およびSS105のSuperdex 200 columnにより分析ゲルろ過の結果を示す。いずれもシングルピークで、見かけ上の分子量約40 kDaを示した。

[図24]図24は、精製したヒト化MABL-2抗体HL5 SS44およびSS105の還元と非還元条件SDS-PAGE分析の結果を示す。SS44およびSS105は還元条件でmonomerの分子量位置(約26 kDa)に単一のバンドを示し、非還元条件でdimerの分子量位置(約45 kDa)に単一のバンドを示した。

[図25]図25は、ヒト化MABL-2 HL5 SS44およびヒト化MABL-2 HL5 がヒトIAP遺伝子を導入したL1210細胞に細胞死を誘導することを示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### [0011] CD47

本発明で用いられるCD47は特に限定されず、どのような動物由来のCD47でもよい

が、好ましくは哺乳動物由来CD47であり、さらに好ましくはヒトCD47である。ヒトCD47のアミノ酸配列・塩基配列は既に公知である(J. Cell. Biol., 123, 485-496,(1993)、Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, (1995)、GenBank:Z25521)。

- [0012] 本発明において抗CD47抗体は、CD47への結合能を有する限り特に制限はなく、マウス抗体、ヒト抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体等を適宜用いることができる。また、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え抗体、例えばキメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体等も使用できる。さらに、本発明の抗CD47抗体は、CD47を発現している細胞(例えば、骨髄系細胞、リンパ球など)にアポトーシスを誘起させる特性を有していることが好ましい。

#### ヒト化抗体

本発明は、抗CD47抗体のヒト化抗体に関するものである。

- [0013] 抗体のL鎖及びH鎖の各可変領域(V領域)は抗原結合部位を形成し、L鎖及びH鎖上の可変領域は共通性のある比較的保存された4個のフレームワーク領域(framework region; FR)と3個の超可変又は相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)により連結されている(Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。
- [0014] 前記4個のフレームワーク領域(FR)の多くの部分は $\beta$ -シート構造をとり、その結果3個のCDRはループを形成し、CDRは場合により $\beta$ -シート構造の一部分を形成することもある。3個のCDRはFRによって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして対をなす領域の3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。
- [0015] これらのCDR領域は、得られた抗体のV領域のアミノ酸配列と既知抗体のV領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができる。
- [0016] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、これは、非ヒト動物由来抗体(例えばマウス抗体など)の相補性決定領域(CDR)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている(欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照)。
- [0017] 具体的には、非ヒト動物がマウスの場合、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワ

ーク領域とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する(WO98/13388号公報に記載の方法を参照)。

- [0018] CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K.etal., CancerRes. (1993) 53, 851-856)。
- [0019] ヒト化抗体のL鎖V領域は、ヒト由来抗体のL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)と非ヒト動物由来抗体のL鎖V領域のCDRを含み、ヒト化抗体のH鎖V領域はヒト由来抗体のH鎖V領域のフレームワーク領域(FR)と非ヒト動物由来抗体のH鎖V領域のCDRを含む。
- [0020] ヒト化抗体のC領域には、通常、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$ 、 $C\gamma 4$ を、L鎖では $C\kappa$ 、 $C\lambda$ を使用することができる。また、抗体またはその產生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。
- [0021] 非ヒト動物由来抗体は、特に限定されず、マウス抗体、ラット抗体、ハムスター抗体、イヌ抗体、サル抗体など、ヒト以外のいかなる動物由来の抗体でもよいが、好ましくは非ヒト哺乳類由来抗体であり、さらに好ましくはげっ歯類由来抗体であり、特に好ましくはマウス抗体である。
- [0022] ヒト由来のFRおよび非ヒト動物由来のCDRのアミノ酸配列は、一部改変(例えば、欠失、置換又は付加)してもよい。
- [0023] CD47への結合活性を有する限り、本発明のヒト化抗CD47抗体のCDR、FRのアミノ酸配列は特に限定されず、どのような配列を用いてもよい。CDRとしては以下のいずれかのアミノ酸配列をもつものが好ましい：
- (1)配列番号7のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (2)配列番号10のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

- (3)配列番号13のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (4)配列番号16のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (5)配列番号19のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (6)配列番号22のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (7)配列番号30のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (8)配列番号37のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (9)配列番号40のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (10)配列番号43のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (11)配列番号46のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (12)配列番号49のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (13)配列番号52のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (14)配列番号57のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
- (15)配列番号64のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
- (16)配列番号67のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)。

[0024] また、FRとしては以下のいずれかのアミノ酸配列をもつものが好ましい：

- (1) 配列番号7のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (2) 配列番号10のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (3) 配列番号13のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (4) 配列番号16のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (5) 配列番号19のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (6) 配列番号22のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (7) 配列番号30のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)  
、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)
- (8) 配列番号37のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)  
、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (9) 配列番号40のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)  
、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (10) 配列番号43のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)  
、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (11) 配列番号46のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)  
、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (12) 配列番号49のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)  
、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (13) 配列番号52のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)  
、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)
- (14) 配列番号57のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)

FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)  
(15)配列番号64のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)  
(16)配列番号67のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)。

#### 抗CD47抗体の作製及びCDR配列

非ヒト動物由来抗体のCDR配列は、当業者に公知の方法により得ることが可能である。

- [0025] まず、当業者に公知の方法により抗CD47抗体を作製する。例えば、CD47タンパク質又はその部分ペプチドを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングする。具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。
  - [0026] まず、抗体取得の感作抗原として使用されるCD47タンパク質を、GenBank:Z25521等に開示されたCD47遺伝子／アミノ酸配列を参考に発現させる。すなわち、CD47をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のCD47タンパク質を公知の方法で精製する。
  - [0027] 次に、この精製CD47タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、CD47の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはCD47のアミノ酸配列より化学合成により得ることも可能である。
  - [0028] 抗CD47抗体の認識するCD47分子上のエピトープは特定のものに限定されず、CD47分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよい。従って、抗CD47抗体を作製するための抗原は、CD47分子上に存在するエピトープを含む断片ならば、如何なる断片も用いることが可能である。
  - [0029] 感作抗原で免疫される非ヒト動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげつ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用され

る。

- [0030] 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的な方法として、感作抗原を非ヒト動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。
- [0031] このように非ヒト動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、非ヒト動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。
- [0032] 前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3(P3x63Ag8.653)(J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1(Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11(Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0(Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO(de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194(Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210(Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が好適に使用される。
- [0033] 前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。
- [0034] より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。
- [0035] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用い

る培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

- [0036] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG溶液(例えば平均分子量1000-6000程度)を通常30-60% (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。
- [0037] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間(通常、数日一数週間)継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよび单一クローニングを行う。
- [0038] このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。
- [0039] 当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るために適しており、一方、後者の方は、抗体の大量生産に適している。
- [0040] 次に、抗CD47抗体を產生するハイブリドーマから、抗CD47抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート・グアニジン・塩酸法、グアニジン・チオシアネート・塩化セシウム法、アルカリショ糖密度勾配遠心分離

法、AGPC法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

- [0041] 得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業社製)等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-AmpliFINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)等を使用することができる。
- [0042] 得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。

#### FR配列

ヒト由来FR配列は既にアミノ酸配列が解明されている既知のヒト抗体の配列を使用することが可能である。例えば、Protein Data bankに登録されている天然ヒト抗体の配列を利用することが可能である。

- [0043] 使用するFR配列は、CDR配列の由来となっている抗体のFR配列と最も同一性の高い配列をH鎖・L鎖それぞれ別々に選択する方法、单一のヒト抗体のH鎖・L鎖の組み合わせをそのまま選択する方法、同一サブグループ内からH鎖・L鎖の配列をそれぞれ別々に選択する方法など、いかなる方法により選択されてもよい。

#### 抗体修飾物

本発明の抗体には、抗体に各種分子を結合させた抗体修飾物も含まれる。抗体の修飾物として、細胞傷害性物質やポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を挙げることができる。細胞障害性物質としては、例えば、放射性同位元素、化学療法剤、細菌由来トキシン等を挙げることができる。本発明における「抗体」には、このような他の物質と結合している抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾

物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

[0044] さらに、二重特異性抗体(bispecific antibody)であってもよい。二重特異性抗体はCD47分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特異性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がCD47を認識し、他方の抗原結合部位が細胞傷害性物質などの他の物質を認識してもよい。二重特異性抗体は遺伝子工学的手法により作製することが可能である。

又、抗体の細胞障害活性を増強させる目的で、抗体の糖鎖を改変する技術も知られている(例えば、WO/0061739、WO02/31140など)。

#### 低分子化抗体

本発明の抗体は、低分子化されている低分子化抗体が好ましい。

[0045] 本発明において低分子化抗体とは、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましく、特に好ましいのはVHとVLの両方を含む断片である。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv(シングルチェインFv)、などを挙げができるが、好ましくはscFv (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879–5883、Pluckthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenburg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269–315, (1994))である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968–2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476–496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497–515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652–663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663–669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132–137参照)。

- [0046] 本発明において好ましい低分子化抗体はDiabodyである。Diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント(例えば、scFv等)(以下、Diabodyを構成するフラグメント)を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む(P.Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、WO93/11161号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol.Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。
- [0047] Diabodyを構成するフラグメントは、VLとVHを結合したもの、VLとVLを結合したもの、VHとVHを結合したもの等を挙げることができるが、好ましくはVHとVLを結合したものである。Diabodyを構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常2-14アミノ酸、好ましくは3-9アミノ酸、特に好ましくは4-6アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため、同一鎖上のVLとVHの間で非共有結合がおこらず、単鎖V領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの二量体を形成することができる。二量体を形成する際、Diabodyを構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも共有結合でよく、又、共有結合と非共有結合の両方でもよい。共有結合は互いに外殻電子を共有することによって安定化される結合をいう(例えば、ジスルフィド結合など)。非共有結合は、共有結合を除いた原子間、分子間の相互作用をいい、水素結合、静電的相互作用、ファンデルワールス力が含まれる。
- [0048] Diabodyを構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖Diabody( $\text{sc(Fv)}_2$ )とすることも可能である。その際、Diabodyを構成するフラグメント同士を15-20アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合すると、同一鎖上に存在するDiabodyを構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、二量体を形成することができる。一本鎖Diabodyの例としては、以下のような配置を挙げることができる。

[VH]linker(5)[VL]linker(15)[VH]linker(5)[VL]  
[VL]linker(5)[VH]linker(15) [VH]linker(5)[VL]  
[VH] linker(5) [VL] linker(15) [VL] linker(5) [VH]  
[VH] linker(5) [VH] linker(15) [VL] linker(5) [VL]

さらに、Diabody作製と同じ原理で、Diabodyを構成するフラグメントを3つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

#### 安定化Diabody

本発明はさらに、安定化されたDiabodyを提供する。本発明において安定化されたDiabodyとは、Diabodyを構成するフラグメント間に共有結合が存在するDiabodyのことをいう。Diabodyを構成するフラグメント間に存在する共有結合は、特に限定されずどのような共有結合でもよいが、本発明においてはジスルフィド結合を好適に用いることができる。ジスルフィド結合は当業者に公知の方法でDiabodyに導入することが可能であり、例えば、国際公開公報WO94/29350の方法で行うことが可能である。

- [0049] ジスルフィド結合は通常、Diabody中の選択されたアミノ酸をシステインに置換することによりDiaobodyに導入されるが、他の方法により導入してもよい。Diabodyに導入されるジスルフィド結合の数は限定されず、幾つ導入してもよいが、好ましくは2つのジスルフィド結合がDiabodyに導入される。この場合、通常、第一のDiabodyを構成するフラグメントのVHに導入されたシステインと第二のDiabodyを構成するフラグメントのVLに導入されたシステインが1つ目のジスルフィド結合を形成し、第一のDiaobodyを構成するフラグメントのVLに導入されたシステインと第二のDiabodyを構成するフラグメントのVHに導入されたシステインが2つ目のジスルフィド結合を形成する。
- [0050] ジスルフィド結合が導入される位置は特に限定されず、適宜選択した位置に導入することが可能であるが、CDRにジスルフィド結合が導入されるとDiabodyの結合活性に影響を与える可能性があるので、一般的には、FRにジスルフィド結合が導入される。国際公開公報WO94/29350では、ジスルフィド結合を導入する好ましい位置として、以下の位置が挙げられている。

VH44 – VL100

VH105 – VL43

VH105 – VL42

VH44 – VL101

VH106 – VL43

VH104 – VL43

VH44 – VL99

VH45 – VL98

VH46 – VL98

VH103 – VL43

VH103 – VL44

VH103 – VL45

上記アミノ酸番号の位置はKabat and Wuにより利用される番号付け系における位置である。本発明においては、好ましい位置としてはVH44 – VL100、VH105 – VL43を挙げることができる。

#### リンカー

本発明において、H鎖V領域とL鎖V領域とを連結するリンカー又は一本鎖Diobodyを作製する際のDiobodyを構成するフラグメント同士を連結するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299–305, 1996に開示されるリンカーを用いることができる。例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly•Ser

Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly  
 Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser  
 Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly  
 (Gly·Gly·Gly·Gly·Ser)<sub>n</sub>  
 (Ser·Gly·Gly·Gly·Gly)<sub>n</sub>

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。リンカーペプチドの長さは目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

- [0051] 本発明における合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スペレート(BS<sup>3</sup>)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。
- [0052] 特に、Diabodyを作製する場合、宿主細胞で產生されたDiabodyを構成するフラグメントを培地等の溶液中で、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上ダイマー化するのに適したリンカーを選択することが好ましい。

#### 抗体の製造

前記のようにして得られた本発明の抗体をコードする遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

- [0053] また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40(SV40)等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$ (HEF1 $\alpha$ )などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。
- [0054] SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法(Nature(1979)277, 108)により、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法(Nucleic Acids Res.(1990)18, 5322)により、容易に遺伝子発現を行うことができる。
- [0055] 大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法(Nature(1998)341, 544-546; FASEB J.(1992)6, 2422-2427)により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法(Science(1988)240, 1041-1043)により発現することができる。
- [0056] 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol.(1987)169, 4379)を使用すればよい。そして、ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して(refold)使用する。
- [0057] 複製起源としては、SV40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス(BPV)等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。
- [0058] 本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細

胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

- [0059] 好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。
- [0060] 次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を产生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。
- [0061] 前記のように発現、產生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephadex G-25 (Pharmacia製)等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

#### 抗体の活性の確認

抗体の抗原結合活性(Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)の測定には公知の手段を使用することができる。

- [0062] 抗原結合活性を測定する方法として、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、CD47をコーティングしたプレートに、抗CD47抗体を含む試料、例えば、抗CD47抗体產生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフェオスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル磷酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

### アポトーシス誘起活性の確認

アポトーシスを誘起するか否かの確認は、当業者に公知の方法で行うことが可能である(例えば、日本公開公報:特開平9-295999など)。具体的には、実施例に記載の方法や、ヒト白血病細胞やCD47遺伝子を導入したJurkat細胞・L1210細胞・JOK-1細胞などのCD47発現細胞を、被検抗体の存在下で培養し、MTS法やフローサイトメトリーによりアポトーシスを検出する方法などにより行うことが可能である。

### 血液疾患治療薬

本発明はまた、本発明の抗体を有効成分として含有する血液疾患治療薬に関する。本発明の血液疾患治療薬は、例えば急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髓腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫(Hodgkin病、非Hodgkinリンパ腫)、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群、真性多血症などの血液疾患の治療に有用である。

- [0063] 本発明の抗体を血液疾患治療薬として用いる場合、有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01～100000mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明のヒト化抗CD47抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。
- [0064] また、本発明の治療剤の投与時期としては、疾患の臨床症状が生ずる前後を問わず投与することができる。
- [0065] 本発明の治療剤は1日1～3回、一週間に1日～7日投与することが可能である。また、点滴注入のように持続投与することも可能であり、例えば1～3日間投与することが可能である。
- [0066] 本発明の治療剤は、通常、非経口投与で、例えば注射剤(皮下注、静注、筋注、腹腔内注など)で投与されるが、特に限定されず、経皮、経粘膜、経鼻、経肺、経口などで投与してもよい。
- [0067] しかしながら、本発明の治療剤は上記投与量、投与方法などに限定されるものではない。
- [0068] 本発明の本発明の抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製

剤化することができ(Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton,米国)、医薬的に許容される担体や添加物と共に含むものであってもよい。

- [0069] このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。
- [0070] 実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。
- [0071] 本発明のヒト化抗CD47抗体は、ヒトCD47遺伝子を導入したL1210細胞、MOLT4細胞、JOK-1細胞に著しい細胞死を誘導した。また、ヒト白血病マウスモデルを用いて試験した結果、本発明のヒト化抗CD47抗体は抗腫瘍効果を示すことが確認された。
- [0072] 本発明のヒト化抗CD47抗体は、whole IgGに比べて組織、腫瘍への移行性に優れており、さらに赤血球の凝集という副作用が顕著に低減されたか又は生じないため、例えば急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髓腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫(Hodgkin病、非Hodgkinリンパ腫)、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群、真性多血症などの血液疾患の治療薬としての利用が期待される。

また、RI標識による造影剤としての利用も期待され、RI化合物やトキシンと結合させることにより、効力を増強させることも可能である。

- [0073] 本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

### 実施例

- [0074] 実施例1:ヒト化MABL-2抗体の構築

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、マウスモノクローナル抗体のFRとヒト抗体のFRとの間に高い相同意が存在することが望ましい。従って、マウスマABL-2抗体(WO00/53634)のL鎖およびH鎖のV領域を、Protein Data Bankを用いて構造が解明されている既知の天然ヒト抗体のV領域と比較した。

- [0075] (1)ヒト化抗体H鎖の構築

#### (i) 1次デザイン

マウスマABL-2抗体のH鎖V領域と4クローンが75.9%の相同意を示した。このうち、CDR近辺のアミノ酸は抗原結合に大きく関与している可能性があるため、CDR1の直前の30位が保存されているヒト抗体AF216824(Miklos J.A.ら、Blood,95, 3878-3884, 2000)由来のFRを用いることとした。ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"1.1")において、FR1からFR4まではヒト抗体AF216824のFR1からFR4と同一であり、そしてCDRはマウスマABL-2抗体のH鎖V領域中のCDRと同一とした。AF216824にはLeader配列の情報がなかったため、Leader配列はマウスマABL-2 V<sub>H</sub>のものを用いた。

- [0076] ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"1.1")をPCR法によるCDRグラフィングにより作製した。ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"1.1")の作製のために4個の合成オリゴDNAを使用した。合成オリゴDNA、HuMHa1S(配列番号1)及びHuMHa3S(配列番号2)はセンスDNA配列を有し、HuMHa2AS(配列番号3)及びHuMHa4AS(配列番号4)はアンチセンスDNA配列を有する。外部プライマーHuMHS(配列番号5)及びHuMHAS(配列番号6)は合成オリゴDNA、HuMHa1S及びHuMHa4ASとホモロジーを有する。

- [0077] PCRは、KOD -Plus-(東洋紡社)を用い、100 mLの反応混合液に合成オリゴDNA HuMHa1S、HuMHa2AS、HuMHa3SおよびHuMHa4ASをそれぞれ5 pmol、0.2 mmol/LのdNTP並びに2 UのKOD -Plus- を含む条件で、添付緩衝液を使用して94 °Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで5回行った。さらに40 pmolの外部プライマーHuMHS及びHuMHASを加え、同じ温度サイクルを35回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1.2%アガロースを用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。
- [0078] 438 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10 mmol Tris-HCl (pH7.4), 1 mmol/L EDTA溶液 50 μLに溶解した。得られたPCR反応混合物を、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したHEF発現ベクターHEF-VH-g γ 1にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しいH鎖V領域のアミノ酸配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-huM2H1.1#1と命名した。本プラスミドHEF-huM2H1.1#1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号7に示す。
- [0079] ヒト化MABL-2抗体H鎖V領域の各バージョン1.2, 1.3, 1.4, 1.5を以下のようにして作製した。
- [0080] バージョン1.2は変異原プライマーとして72位のアルギニンがセリンに変異するよう設計したHuMHbS(配列番号8)およびHuMHbAS(配列番号9)を用い、プラスミドHEF-huM2H1.1#1を鑄型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2H1.2#1を得た。本プラスミドHEF-huM2H1.2#1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号10に示す。
- [0081] バージョン1.3は変異原プライマーとして30位のアラニンがトレオニンに変異するよう設計したHuMHcS(配列番号11)およびHuMHcAS(配列番号12)を用い、プラスミドHEF-huM2H1.2#1を鑄型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2H1.3#2を得た。本プラスミドHEF-huM2H1.3#2に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号13に示す。
- [0082] バージョン1.4は変異原プライマーとして67位のアルギニンがリジンに変異するよう

に設計したHuMHdS(配列番号14)およびHuMHdAS(配列番号15)を用い、プラスミドHEF-huM2H1.2#1を鑄型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2H1.4#1を得た。本プラスミドHEF-huM2H1.4#1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号16に示す。

- [0083] バージョン1.5は変異原プライマーとして70位のメチオニンがロイシンに変異するよう設計したHuMHeS(配列番号17)およびHuMHeAS(配列番号18)を用い、プラスミドHEF-huM2H1.2#1を鑄型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2H1.5#1を得た。本プラスミドHEF-huM2H1.5#1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号19に示す。

[0084] (ii) 2次デザイン

ヒト化MABL-2抗体H鎖バージョン"1.3"について、72位のアミノ酸の保存およびFR2のできる限りの保存を考慮し、再度相同性を検索した。このうち、72位が保存されているヒト抗体HUMIGHDJCD(Chai S. K.ら、Unpublished 1994)由来のFRを用いることとした。ヒト化MABL-2抗体H鎖バージョン"2.1"において、FR1からFR4まではヒト抗体HUMIGHDJCDのFR1からFR4と同一であり、そしてCDRはマウスMABL-2抗体のH鎖V領域中のCDRと同一とした。HUMIGHDJCDにもLeader配列の情報がなかったため、Leader配列はマウスMABL-2 V<sub>H</sub>のものを用いた。

- [0085] ヒト化MABL-2抗体H鎖バージョン"2.1"はバージョン"1.3"の89位のアスパラギン酸をアスパラギンに変異させたバージョン2.0を鑄型DNAとして用いた。

- [0086] まず、バージョン2.0はバージョン"1.3"の89位のグルタミン酸をアスパラギン酸に変異するように設計したHuMHgS(配列番号20)およびHuMHgAS(配列番号21)を用い、プラスミドHEF-huM2H1.3#2を鑄型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2H2.0#1を得た。本プラスミドHEF-huM2H2.0#1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号22に示す。

- [0087] ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"2.1")をPCR法によるCDRグラフティングにより作製した。ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"2.1")の作製のために8個の合成オリゴDNA(PCRプライマー)を使用した。合成オリゴDNA、HuMHS(配列番号5)、HuMHfS1(配列番号23)、HuMHfS2(配列番号24)、及びHuMHfS3(配列番号25)は

センスDNA配列を有し、HuMHfAS1(配列番号26)、HuMHfAS2(配列番号27)、HuMHfAS3(配列番号28)、及びHuMHfAS(配列番号29)はアンチセンスDNA配列を有する。

- [0088] 第一PCR段階では次のPCRプライマーの組み合わせにて、HEF-huM2H2.0#1を鑄型DNAとして用いた。4つの反応HuMHS/HuMHfAS1、HuMHfS1/HuMHfAS2、HuMHfS2/HuMHfAS、HuMHfS3/HuMHfAS3を行い、各PCR生成物を精製した。各生成物huM2H2.1-1、huM2H2.1-2、huM2H2.1-3、huM2H2.1-4を、huM2H2.1-1/huM2H2.1-2、huM2H2.1-3/huM2H2.1-4の組み合わせで混合し、それぞれそれら自体の相補性によりアッセンブリさせ、第二PCRを行った。PCRプライマーはそれぞれHuMHS/HuMHfAS2、HuMHfS2/HuMHfAS3を用いて行い、各PCR生成物を精製した。更に、第二PCRからの2つのPCR生成物をそれぞれそれら自体の相補性によりアッセンブリさせ、PCRプライマーHuMHSとHuMHfAS3を加えて、ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"2.1")をコードする全長DNAを増幅した(第三PCR)。
- [0089] 第一PCR段階において、50 mLの反応混合液に各PCRプライマーをそれぞれ20 pmol、0.2 mmol/LのdNTP、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、5 ngの鑄型DNA並びに1 UのKOD -Plus- を含む条件で、添付緩衝液を使用して94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで35回行い、次に68°Cで7分間インキュベートした。PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。第二PCRにおいては1 mLの各第一PCR生成物および2 UのKOD -Plus-を含有する100 mLの反応混合液を94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで5回インキュベートし、68°Cで5分間インキュベートした後、各PCRプライマーを40 pmolずつ添加した。続いて、第一PCRと同一の条件にて35回のPCRを行い、PCR生成物を1.2%アガロースゲル電気泳動により分離精製した。第三PCRは第二PCR生成物と各PCRプライマーとを用いて、第二PCRと同一の方法にて行った。
- [0090] 第三PCRにより生じた438 bpのDNA断片を1.2%アガロースゲル電気泳動により分離精製した。精製したDNAをBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したHEF発現ベクターHEF-VH-g γ 1にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しいH鎖

V領域のアミノ酸配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-huM2H2.1#3と命名した。本プラスミドHEF-huM2H2.1#3に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号30に示す。

[0091] (2)ヒト化MABL-2抗体L鎖の構築

(i) 1次デザイン

マウスMABL-2抗体のL鎖V領域と2クローンが83.8%の相同性を示した。このうち、CDR3のサイズが等しいヒト抗体HSJC11VJ (Kennedy M.A., J. Exp. Med, 173 (4), 1033-1036, 1991) 由来のFRを用いることとした。ヒト化MABL-2抗体L鎖(バージョン"1.1")において、FR1からFR4まではヒト抗体HSJC11VJのFR1からFR4と同一であり、そしてCDRはマウスMABL-2抗体のL鎖V領域中のCDRと同一とした。Leader配列はヒト抗体HSJC11VJのものを用いた。

[0092] ヒト化MABL-2抗体L鎖(バージョン"1.1")をPCR法によるCDRグラフティングにより作製した。ヒト化MABL-2抗体L鎖(バージョン"1.1")の作製のために4個の合成オリゴDNAを使用した。合成オリゴDNA、HuMLa1S(配列番号31)及びHuMLa3S(配列番号32)はセンスDNA配列を有し、HuMLa2AS(配列番号33)及びHuMLa4AS(配列番号34)はアンチセンスDNA配列を有する。外部プライマーHuMLS(配列番号35)及びHuMLAS(配列番号36)は合成オリゴDNA、HuMLa1S及びHuMLa4ASとホモジニティを有する。

[0093] PCRは、KOD -Plus-(東洋紡社)を用い、100 mLの反応混合液に合成オリゴDNA HuMLa1S、HuMLa2AS、HuMLa3SおよびHuMLa4ASをそれぞれ5 pmol、0.2 mmol/L のdNTP並びに2 UのKOD -Plus- を含む条件で、添付緩衝液を使用して94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで5回行った。さらに40 pmolの外部プライマーHuMLS及びHuMLASを加え、同じ温度サイクルを35回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1.2%アガロースを用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

[0094] 426 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10 mmol Tris-HCl(pH7.4), 1 mmol/L EDTA溶液

50 mLに溶解した。得られたPCR反応混合物を、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したHEF発現ベクターHEF-VL-g κ 1 (WO92/19759)にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しいL鎖V領域のアミノ酸配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-huM2L1.1#3と命名した。本プラスミドHEF-huM2L1.1#3に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号37に示す。

- [0095] ヒト化MABL-2抗体L鎖V領域の各バージョン1.2, 1.3, 1.4, 1.5を以下のようにして作製した。
  - [0096] バージョン1.2は変異原プライマーとして51位のアルギニンがロイシンに変異するように設計したHuMLbS(配列番号38)およびHuMLbAS(配列番号39)を用い、プラスミドHEF-huM2L1.1#3を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2L1.2#1を得た。本プラスミドHEF-huM2L1.2#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号40に示す。
  - [0097] バージョン1.3は変異原プライマーとして92位のチロシンがフェニルアラニンに変異するように設計したHuMLcS(配列番号41)およびHuMLcAS(配列番号42)を用い、プラスミドHEF-huM2L1.1#3を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2L1.3#1を得た。本プラスミドHEF-huM2L1.3#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号43に示す。
  - [0098] バージョン1.4は変異原プライマーとして41位のフェニルアラニンがチロシンに変異するように設計したHuMLdS(配列番号44)およびHuMLdAS(配列番号45)を用い、プラスミドHEF-huM2L1.1#3を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2L1.4#1を得た。本プラスミドHEF-huM2L1.4#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号46に示す。
  - [0099] バージョン1.5は変異原プライマーとして42位のグルタミンがロイシンに変異するように設計したHuMLeS(配列番号47)およびHuMLeAS(配列番号48)を用い、プラスミドHEF-huM2L1.1#3を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2L1.5#1を得た。本プラスミドHEF-huM2L1.5#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号49に示す。
- [0100] (ii) 2次デザイン

ヒト化MABL-2抗体L鎖について、FR2のWYLNQ-PGQSP-LIYという配列の保存を考慮し、再度相同性を検索した。このうち、相同性の最も高かったヒト抗体1802359A (Pascual V.ら、J. Immunol., 146(12), 4385-4391, 1991) 由来のFRを用いることとした。ヒト化huM2抗体L鎖バージョン"2.1"において、FR1からFR4まではヒト抗体1802359A のFR1からFR4と同一であり、そしてCDRはマウスMABL-2抗体のL鎖V領域中のCDRと同一とした。1802359A のLeader配列の情報はなかったため、1次デザインで用了たヒト抗体HSJC11VJのものを用いた。

- [0101] ヒト化MABL-2抗体L鎖バージョン"2.1"はバージョン"1.1"のFR2のみをヒト抗体1802359AのFR2へ置換したバージョン2.0を鑄型DNAとして用了た。
- [0102] まず、バージョン2.0は変異原プライマーとしてヒト化MABL-2抗体L鎖バージョン"1.1"のFR2がヒト抗体1802359AのFR2に変異するように設計したHuMLfS (配列番号50) およびHuMLfAS (配列番号51) を用い、プラスミドHEF-huM2L1.1#3を鑄型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-huM2L2.0#1を得た。本プラスミドHEF-huM2L2.0#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号52に示す。
- [0103] 次にヒト化MABL-2抗体L鎖バージョン"2.1"をPCR法によるCDRグラフティングにより作製した。ヒト化MABL-2抗体H鎖(バージョン"2.1")の作製のために6個の合成オリゴDNA (PCRプライマー) を用了た。合成オリゴDNA、HuMLS (配列番号35)、HuMLgS0 (配列番号53)、HuMLgS (配列番号54) はセンスDNA配列を有し、HuMLAS (配列番号36)、HuMLgAS0 (配列番号55)、HuMLgAS (配列番号56) はアンチセンスDNA配列を有する。
- [0104] 第一PCR段階では次のPCRプライマーの組み合わせにて、HEF-huM2L2.0#1を鑄型DNAとして用了た。HuMLS/HuMLgAS0、HuMLgS0/HuMLgAS、HuMLgS/HuMLASにてPCRを行い、各PCR生成物を精製した。各生成物huM2L2.1-1、huM2L2.1-2、huM2L2.1-3をそれぞれそれら自体の相補性によりアンプリさせ、PCRプライマーHuMLSとHuMLASを加えて、ヒト化MABL-2抗体L鎖(バージョン"2.1")をコードする全長DNAを増幅した(第二PCR)。
- [0105] 第一PCR段階において、50 mLの反応混合液に各PCRプライマーをそれぞれ20

pmol、0.2 mmol/LのdNTP、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、5 ngの錆型DNA並びに1 UのKOD -Plus- を含む条件で、添付緩衝液を使用して94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで35回行い、次に68°Cで7分間インキュベートした。PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。第二PCRにおいては1 mLの各第一PCR生成物および2 UのKOD -Plus-を含有する100 mLの反応混合液を94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで5回インキュベートし、68°Cで5分間インキュベートした後、各PCRプライマーを40 pmolずつ添加した。続いて、第一PCRと同一の条件にて35回のPCRを行い、PCR生成物(426 bp)を1.2%アガロースゲル電気泳動により分離精製した。

[0106] 精製したDNAをBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したHEF発現ベクターHEF-VL-g κ 1にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しいL鎖V領域のアミノ酸配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-huM2L2.1#1と命名した。本プラスミドHEF-huM2L2.1#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号57に示す。

[0107] (3) COS-7細胞へのトランスフェクション

ヒト化抗体の各鎖の抗原結合活性を評価するため、前記発現プラスミドと陽性対照としてキメラMABL-2抗体をCOS-7細胞で一過性に発現させた。すなわちH鎖の一過性発現では、ヒト化MABL-2抗体H鎖発現ベクター(HEF-huM2H1.1#1, HEF-huM2H1.2#1, HEF-huM2H1.3#2, HEF-huM2H1.4#1, HEF-huM2H1.5#1, HEF-huM2H2.1#3)とキメラL鎖発現ベクターHEF-M2L3 (WO00/53634)との組み合わせを、L鎖の一過性発現では、ヒト化MABL-2抗体L鎖発現ベクター(HEF-huM2L1.1#3, HEF-huM2L1.2#1, HEF-huM2L1.3#1, HEF-huM2L1.4#1, HEF-huM2L1.5#1, HEF-huM2L2.1#1)とキメラH鎖HEF-M2H3 (WO00/53634)との組み合わせを、それぞれFugene 6 Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いてCOS-7細胞に同時形質導入した。1.5 × 10<sup>5</sup> 細胞を10%のウシ胎児血清(GIBCO)を含むDMEM培養液(GIBCO)2 mLにて一晩培養した。そこへ室温で1時間反応させた、各プラスミド2 mgずつとFugene 6 Transfection Reagent 6 mLを含む総

量100 mL のDMEM培養液を添加した。37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で一晩培養した後、1% HT supplement (GIBCO) を含むCHO-S-SFMII培地 (GIBCO) 2 mLへ培地交換を行った。37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で72時間培養した後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

[0108] キメラMABL-2抗体の一過性発現では、キメラH鎖HEF-M2H3とキメラL鎖HEF-M2L3を用いて、前記の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。

[0109] また、ヒト化MABL-2抗体を評価するため、ヒト化huM2抗体H鎖発現ベクターHEF-huM2H2.1#3とヒト化MABL-2抗体L鎖発現ベクターHEF-huM2L 2.1#1との組み合わせを用いて、前記の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。

[0110] (4) 抗体濃度の測定

得られた抗体の濃度測定はELISAにより行った。ELISA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>) で2 mg/mLの濃度に調製したマウス 抗ヒト Kappa Light Chain (Zymed) 100 mLで固相化し、300 mLの希釈バッファー (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% NaN<sub>3</sub>、1% 牛血清アルブミン (BSA)、pH8.1) でブロッキングの後、キメラ抗体またはヒト化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清を段階希釈して各穴に100 mLずつ加えた。1時間室温にてインキュベートし洗浄後、アルカリフィオスマーカーを標識ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Zymed) 100 mLを加えた。室温にてインキュベートし洗浄の後、1 mg/mLの基質溶液 (Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして、ヒトIgG1, kappa (SIGMA) を用いた。

[0111] (5) ヒト化抗体の活性測定

ヒト化抗体は下記の抗原結合活性および結合阻害活性にて評価を行った。

[0112] (i) 抗原結合活性の測定

抗原結合活性測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで3 μg/mLの濃度に調製した抗FLAG抗体 (

SIGMA) 100  $\mu$  Lで固相化した。300  $\mu$  Lの希釈バッファーでブロッキングの後、1  $\mu$  g/mLの濃度に調製したFLAG標識可溶型ヒトCD47 (WO00/53634) を100  $\mu$  L加え、室温で1時間インキュベーションした。洗浄後、キメラ抗体またはヒト化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートし洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Zymed) 100  $\mu$  Lを加えた。室温にてインキュベートし洗浄の後、1 mg/mLの基質溶液 (Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。

[0113] (ii) 結合阻害活性の測定

結合阻害活性測定のためのプレートは以下のようにして調製した。抗原結合活性と同様、ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで3  $\mu$  g/mLの濃度に調製した抗FLAG抗体 (SIGMA) 100  $\mu$  Lで固相化した。300  $\mu$  Lの希釈バッファーでブロッキングの後、1  $\mu$  g/mLの濃度に調製したFLAG標識可溶型ヒトCD47 (WO00/53634) を100  $\mu$  L加え、室温で1時間インキュベーションした。洗浄後、キメラ抗体またはヒト化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清を段階希釈したものと0.6  $\mu$  g/mLのビオチン標識MABL-2を等量混合した溶液を100  $\mu$  Lずつ加えた。室温にてインキュベートし洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (Zymed) 100  $\mu$  Lを加えた。室温にてインキュベートし洗浄の後、1 mg/mLの基質溶液 (Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定した。

[0114] (6) 活性確認

(i) ヒト化H鎖の評価

ヒト化H鎖バージョン1.1、1.2、1.3とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体と同程度のヒトCD47結合活性を示した(図1)。しかし、MABL-2による結合阻害活性ではバージョン1.1の阻害活性はバージョン1.2、1.3に比べて弱かつた。また、バージョン1.3はキメラ抗体とほぼ同等の阻害活性を持ち、バージョン1.2と同等もしくは若干強い阻害活性を示した(図2)。この結果は、72位のアミノ酸残基の保存が重要であり、30位のアミノ酸残基はトレオニン(バージョン1.3)でも良いことを示す。

- [0115] さらなる活性の上昇を考慮し、新たにH鎖バージョン1.4、1.5を作製した。H鎖バージョン1.4、1.5とキメラL鎖を組み合わせた抗体の結合活性はキメラ抗体およびバージョン1.3と同等であった(図3)が、阻害活性はより弱かった(図4)。この結果は67位、70位のアミノ酸残基は保存すべきであることを示唆する。
- [0116] バージョン1.1～1.5の結果を踏まえて二次デザインを行い、バージョン2.1を作製した。バージョン2.1はMABL-2による結合阻害活性ではキメラ抗体とほぼ同等であった(図5)。この結果より、ヒト化H鎖はバージョン2.1で十分であることが示唆された。
- [0117] (ii) ヒト化L鎖の評価  
ヒト化L鎖バージョン1.1、1.2、1.3とキメラH鎖を組み合わせた抗体は三種ともほぼ同等のヒトCD47に対する結合活性を示したが、キメラ抗体より弱い活性を示した(図6)。さらに、MABL-2による結合阻害活性では三種いずれもキメラ抗体に比べて弱かった(図7)。この結果は、51位、92位のアミノ酸残基は特に重要ではなく、他に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。
- [0118] L鎖のFR2はH鎖とのinterfaceにあたる(Chothia C.ら、J. Mol. Biol. 186, 651-663, 1985)ことから、FR2のCDR近傍のアミノ酸を調べた。バージョン1.4はほぼキメラ抗体と同様な結合活性を示した。バージョン1.5は1.4より弱かったが、1.1より強かった。(図8)。結合阻害活性についてもバージョン1.4は1.1よりも大幅に改善し、阻害活性がキメラ抗体に近づいた(図9)。バージョン1.5はキメラ抗体よりは明らかに弱いが、1.1に比べるとやや改善していた(図9)。この結果はやはりFR2は重要であり、特に41位、42位近傍のアミノ酸残基が活性の向上に必須であることが示唆された。
- [0119] バージョン1.1～1.5の結果を踏まえて二次デザインを行い、バージョン2.1を作製した。ヒト化L鎖バージョン2.1とキメラH鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体と同程度のMABL-2による結合阻害活性を示した(図10)。この結果より、ヒト化L鎖はバージョン2.1で十分であることが示唆された。
- [0120] (iii) ヒト化MABL-2抗体の評価  
ヒト化H鎖バージョン2.1とヒト化L鎖バージョン2.1を組み合わせた抗体は、キメラ抗体と同程度もしくはそれ以上のMABL-2による結合阻害活性、すなわちhCD47に対する親和性を示した(図11)。これより、FRに関してH鎖、L鎖とも単一の天然ヒト抗体

の配列を持つ、ヒト化MABL-2抗体の構築ができた。

#### 実施例2:ヒト化MABL-1抗体の構築

マウスMABL-1抗体(WO00/53634)についてもヒト化を行った。マウスMABL-1抗体とマウスMABL-2抗体におけるCDRのアミノ酸配列はH鎖で3残基、L鎖で4残基異なるのみである。これより、マウスMABL-1抗体のヒト化抗体の構築は[実施例1]に示したマウスMABL-2抗体の二次デザイン(huM2Hバージョン2.1、huM2L2.1バージョン2.1)をもとに構築することとした。

##### [0121] (1)ヒト化MABL-1抗体H鎖の構築

ヒト化MABL-1抗体H鎖バージョン"2.1"の作製のために8個の合成オリゴDNAを使用した。合成オリゴDNA、HuMHS(配列番号5)、M1CH1MS(配列番号58)、M1CH2GS(配列番号59)、M1CH3SS(配列番号60)はセンスDNA配列を有し、M1CH1MAS(配列番号61)、M1CH2GAS(配列番号62)、M1CH3SAS(配列番号63)、HuMHAS(配列番号6)はアンチセンスDNA配列を有する。

##### [0122] 第一PCR段階では次のPCRプライマーの組み合わせにて、HEF-huM2H2.1#3を録型DNAとして用いた。4つの反応HuMHS/M1CH1MAS、M1CH1MS/M1CH2GAS、M1CH2GS/M1CH3SAS、M1CH3SS/HuMHASを行い、各PCR生成物を精製した。各生成物をそれぞれ自体の相補性によりアッセンブリさせ、PCRプライマーHuMHSとHuMHASを加えて、ヒト化MABL-1抗体H鎖バージョン"2.1"をコードする全長DNAを増幅した(第二PCR)。実施例1と同様に行い、HEF発現ベクターHEF-VL-gg1にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しいH鎖V領域のアミノ酸配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-huM1H2.1#1と命名した。本プラスミドHEF-huM1H2.1#1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号64に示す。

##### [0123] (2)ヒト化MABL-1抗体L鎖の構築

ヒト化MABL-1抗体L鎖バージョン"2.1"の作製のために4個の合成オリゴDNAを使用した。合成オリゴDNA、HuMLS(配列番号5)、M1CL1aS(配列番号65)はセンスDNA配列を有し、M1CL1aAS(配列番号66)、HuMLAS(配列番号6)はアンチセンスDNA配列を有する。

[0124] 第一PCR段階では次のPCRプライマーの組み合わせにて、HEF-huM2L2.1#1を錆型DNAとして用いた。HuMHS/M1CL1aAS、M1CL1aS/HuMLASにてPCRを行い、各PCR生成物を精製した。各生成物をそれぞれ自体の相補性によりアッセンブリさせ、PCRプライマーHuMLSとHuMLASを加えて、ヒト化MABL-1抗体L鎖バージョン“2.1”をコードする全長DNAを増幅した(第二PCR)。実施例1と同様に行い、HEF発現ベクターHEF-VL-g κ 1にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しいL鎖V領域のアミノ酸配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-huM1L2.1#1と命名した。本プラスミドHEF-huM1L2.1#1に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号67に示す。

[0125] (3)ヒト化MABL-1抗体の発現

ヒト化MABL-1抗体H鎖発現ベクターHEF-huM1L2.1#1とヒト化MABL-1抗体L鎖発現ベクターHEF-huM1L2.1#1を用いて、上記COS-7細胞へのトランスフェクションの方法に従ってヒト化MABL-1抗体を調製した。また、抗体濃度の測定、抗体の活性測定も実施例1に示した方法に従って行った。

[0126] (4)ヒト化MABL-1抗体の活性確認

ヒト化H鎖バージョン2.1とヒト化L鎖バージョン2.1を組み合わせた抗体は、キメラ抗体と同程度もしくはそれ以上のMABL-1による結合阻害活性、すなわちhCD47に対する親和性を示した(図12)。これより、FRに関してH鎖、L鎖とも単一の天然ヒト抗体の配列を持つ、ヒト化MABL-1抗体の構築ができた。

実施例3:ヒト化MABL-1抗体、ヒト化MABL-2抗体のアポトーシス誘起効果

ヒトCD47遺伝子を導入したL1210細胞を用い、ヒト化MABL-1抗体、ヒト化MABL-2抗体のアポトーシス誘起作用をAnnexin-V(ロシュ・ダイアグノスティクス)染色により検討した。細胞 $1 \times 10^5$ 個に、各ヒト抗体発現COS-7細胞培養上清を抗体濃度として300 ng/mL, 100 ng/mL, 33.3 ng/mLずつ添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V染色を行い、FACScan装置(BECTON DICKINSON)にて蛍光強度を測定した。その結果、ヒトCD47遺伝子を導入したL1210細胞に著しい細胞死を誘導した(図13)。

実施例4:ヒト化MABL-1抗体及びヒト化MABL-2抗体由来一本鎖Fvの作製

(1)ヒト化MABL-2抗体一本鎖Fv(HL5)の作製

5 merのペプチドリンカーを有し、N末端より[H鎖]—[L鎖]の順となるようにV領域を連結したヒト化MABL-2抗体一本鎖Fv(HL5)を次の様にして作製した。ヒト化MABL-2抗体H鎖V領域、及びヒト化MABL-2抗体L鎖V領域をそれぞれPCR法にて増幅し、連結することにより、ヒト化MABL-2抗体HL5を作製した。ヒト化MABL-2抗体HL5の作製のために4個のPCRプライマー(A—D)を使用した。プライマーA、Cはセンス配列を有し、プライマーB、Dはアンチセンス配列を有する。

- [0127] H鎖V領域のための前方プライマーSal-huHS(プライマーA、配列番号68)は、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つSalI制限酵素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーhuMHAS-A(プライマーB、配列番号69)は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカーとオーバーラップするように設計した。
- [0128] L鎖V領域のための前方プライマーX5-huLgS(プライマーC、配列番号70)は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、Gly Gly Gly Gly Ser(配列番号72)からなる5merリンカー領域をコードするDNA配列を含み、且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAにオーバーラップするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーNothuLAS(プライマーD、配列番号:71)は、L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし2個の転写停止コドン及びNotI制限酵素認識部位を有するように設計した。
- [0129] 第一PCR段階においてA/B、C/Dのプライマーの組み合わせにて2つの反応を行い、各PCR生成物(huM2Db-1およびhuM2Db-2)を精製した。第一PCRから得られた2つのPCR生成物をそれら自体の相補性によりアッセンブルさせ、プライマーA及びDを加えて、ヒト化MABL-2抗体HL5をコードする全長DNAを増幅した(第二PCR)。なお、第一PCRにおいては、ヒト化MABL-2抗体H鎖V領域をコードするプラスミドHEF-huM2H2.1#3(実施例1を参照)、及びヒト化MABL-2抗体L鎖V領域をコードするプラスミドHEF-huM2L2.1#1(実施例1を参照)をそれぞれ鋳型として用いた。
- [0130] 第一PCR段階において、50 mLの反応混合液に各PCRプライマーをそれぞれ20 pmol、0.2 mmol/LのdNTP、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、5 ngの鋳型DNA並びに1 UのKOD-Plus-を含む条件で、添付緩衝液を使用して94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、

68°Cにて1分間の温度サイクルで35回行い、次に68°Cで7分間インキュベートした。

[0131] PCR生成物A-B(huM2Db-1)及びC-D(huM2Db-2)を1.2%アガロースゲル電気泳動により分離精製し、第二PCRでアッセンブルした。第二PCRにおいて、鑄型として1mLのhuM2Db-1及び1mLのhuM2Db-2、2 UのKOD -Plus-を含有する100 mLの反応混合液を94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで5回インキュベートし、68°Cで5分間インキュベートした後、各PCRプライマーを40 pmolずつ添加した。続いて、第一PCRと同一の条件にて35回のPCRを行い、PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、SalI及びNotIで消化し、得られたDNA断片をpCHO1-Igsベクター(WO00/53634)にクローニングした。なお、本発現ベクターpCHO1-Igsは、哺乳動物細胞分泌発現系に適するマウスIgG1シグナル配列(Nature, 332, 323-327, 1988)を含んでいる。DNA配列決定の後、ヒト化MABL-2抗体HL5の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpCHOhuM2Dbと命名した。本プラスミドpCHOhuM2Dbに含まれるヒト化MABL-2抗体HL5の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号73に示す。

[0132] (2)ヒト化MABL-1抗体一本鎖Fv(HL5)の作製

ヒト化MABL-1抗体HL5を前記ヒト化MABL-2抗体一本鎖Fv(HL5)の作製に従って作製した。第一PCRにおいては、HEF-huM2H2.1#3の代わりにヒト化MABL-1抗体H鎖V領域をコードするプラスミドHEF-huM1H2.1#1(実施例2を参照)、及びHEF-huM2L2.1#1の代わりにヒト化MABL-1抗体抗体L鎖V領域をコードするプラスミドHEF-huM1L2.1#1(実施例2を参照)を使用し、PCR生成物huM1Db-1およびhuM1Db-2を得た。これらを用いた第二PCRにより、ヒト化MABL-1抗体HL5の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドpCHOhuM1Dbを得た。本プラスミドpCHOhuM1Dbに含まれるヒト化MABL-1抗体HL5の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号74に示す。

実施例5:2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含むsc(Fv)<sub>2</sub>の作製

(1)ヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2発現プラスミドの構築

5 mer、15 mer、5 merのペプチドリンカーを有し、N末端より[H鎖]-[L鎖]-[H鎖]-[L鎖]の順となるようにV領域を連結したヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2を発現する

ラスミドを作製するため、前述のPCR生成物huM2Db-1およびhuM2Db-2を以下に示す通りPCR法により更に修飾し、得られたDNA断片をpCHO1-Igsベクターに導入した。

- [0133] ヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2の作製のために前述のPCRプライマーA～Dに加え、2個のPCRプライマーE、Fを使用した。プライマーEはセンス配列を有し、プライマーFはアンチセンス配列を有する。
- [0134] H鎖V領域のための前方プライマーX15huHS(プライマーE、配列番号75)は、以下に記載の15merリンカーの一部とオーバーラップし、且つH鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズするように設計した。また、L鎖V領域のための後方プライマーX15huLAS(プライマーF、配列番号76)は、L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つGly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser(配列番号77)からなる15merリンカー領域をコードするDNA配列にハイブリダイズするように設計した。
- [0135] 第一PCR段階においてC/F、E/Bのプライマーの組み合わせにて2つの反応を行い、各PCR生成物(huM2Db-3およびhuM2Db-4)を精製した。なお、第一PCRにおいては、ヒト化MABL-2抗体L鎖V領域をコードするPCR生成物huM2Db-2(実施例4を参照)、及びヒト化MABL-2抗体H鎖V領域をコードするPCR生成物huM2Db-1(実施例4を参照)をそれぞれ錆型として用いた。第二PCRにおいて、前述のhuM2Db-1とhuM2Db-3、およびhuM2Db-2とhuM2Db-4の組み合わせでそれら自体の相補性によりアッセンブルさせた。次にプライマーAとF、およびEとDを各々に加えて、ヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2をコードする2つの断片DNA(huM2Db-13とhuM2Db-24)を増幅した(第二PCR)。
- [0136] 第一PCR段階において、50 mLの反応混合液に各PCRプライマーをそれぞれ20 pmol、0.2 mmol/LのdNTP、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、各1 mLの錆型DNA並びに1 UのKOD -Plus- を含む条件で、添付緩衝液を使用して94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで35回行い、次に68°Cで7分間インキュベートした。
- [0137] PCR生成物C-F(huM2Db-3)及びE-B(huM2Db-4)を1.2%アガロースゲル電気泳動により分離精製し、第二PCRでhuM2Db-1及びhuM2Db-2とともにアッセンブル

に用いた。第二PCRにおいて、鋳型として各1mLのhuM2Db-1とhuM2Db-3あるいは各1mLのhuM2Db-2とhuM2Db-4、2 UのKOD -Plus-を含有する100 mLの反応混合液を94°Cにて15秒間、50°Cにて30秒間、68°Cにて1分間の温度サイクルで5回インキュベートし、68°Cで5分間インキュベートした後、各PCRプライマーを40 pmolずつ添加した。続いて、第一PCRと同一の条件にて35回のPCRを行い、PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、huM2Db-13をSalI及びBamHIで、huM2Db-24をBamHI及びNotIで消化し、得られたDNA断片をpCHO 1-Igsベクターにクローニングした。DNA配列決定の後、ヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpCHOhuM2scDbと命名した。本プラスミドpCHOhuM2scDbに含まれるヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号78に示す。

[0138] (3)ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2発現プラスミドの構築

5 mer、15 mer、5 merのペプチドリンカーを有し、N末端より[H鎖]—[L鎖]—[H鎖]—[L鎖]の順となるようにV領域を連結したヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2を発現するプラスミドを作製するため、前記ヒト化MABL-2抗体sc(Fv)2発現プラスミドの構築に従い、行った。

[0139] 第一PCRにおいては、PCR生成物huM2Db-2の代わりにヒト化MABL-1抗体L鎖V領域をコードするPCR生成物huM1Db-2、及びPCR生成物huM2Db-1の代わりにヒト化MABL-1抗体H鎖V領域をコードするPCR生成物huM1Db-1を使用し、ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2の正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドpCHOhuM1scDbを得た。本プラスミドpCHOhuM1scDbに含まれるヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号79に示す。

[0140] (4) CHO安定産生細胞株の樹立

前記MABL-2抗体HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>、MABL-1抗体HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>の恒常的発現CHO細胞株を樹立するため、pCHOhuM1Db、pCHOhuM1scDb、pCHOhuM2Db、pCHOhuM2scDbベクターをCHO細胞に遺伝子導入した。

[0141] 各ベクターを、Gene Pulser装置 (BioRad社製)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に形質転換した。DNA (10 μg)とPBSに懸濁したCHO細胞 (1 × 10<sup>7</sup> 細

胞/mL)の0.75 mLを混合したものをキュベットに加え、1.5kV、25 μFの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%のウシ胎児血清を含有する核酸含有α-MEM培地(GIBCO BRL社製)に加え培養した。一夜培養後、培養上清を除去し、PBSにてリノンスした後、10%のウシ胎児血清を含有する核酸不含α-MEM培地(GIBCO BRL社製)を加え培養した。結合標的とする可溶型ヒトCD47をBIACOREセンサーチップCM5(Biacore AB)にアミンカップリング法で固定化し、選択培養により得られたクローンから回収した培養上清をこのセンサーチップへ注入した。このときの結合量から発現濃度を定量し、高発現のクローンをヒト化MABL-1および-2抗体由来のHL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>の產生細胞株として選択した。10nM methotrexate(SIGMA社製)を含む無血清培地C HO-S-SFM II(GIBCO BRL社製)にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

- [0142] (5)ヒト化MABL-1とヒト化MABL-2のHL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>の精製  
前記(4)で得られた培養上清から、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアバタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの3つの工程によりヒト化MABL-1とヒト化MABL-2のそれぞれHL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>の精製(計4種類)を行った。いずれの4種類の抗体も全く同じ方法で精製をした。ヒト化MABL-1及びヒト化MABL-2の違い、HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>の違いにより、精製結果はほとんど変わらなかった。このため精製方法についてはまとめて記載した。図はヒト化MABL-1抗体HL5の場合の精製例のみを示した。
- [0143] 培養上清は、0.02% Tween20を含む20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5で2倍に希釈した後、1 M酢酸でpHを5.5に調整した。この後、0.02% Tween20を含む20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5で平衡化したSP Sepharose Fast Flow column(アマシヤムバイオサイエンス)にかけ、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中0 Mから0.6 MまでのNaClの直線濃度勾配で、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し、HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>を含む画分を集めた(図14)。
- [0144] 第一工程で得られたHL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>画分は、0.1 M NaOHによりpH 6.0～6.5の範囲内に調整した後、それぞれ0.02% Tween20を含む10 mMリン酸緩衝液、pH 7.0で

平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(BIO-RAD、タイプI、20 mm)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を200 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し、目的のポリペプチドが含まれる画分を集めた(図15)。

- [0145] 第二工程で得られた各画分をそれぞれCentriprep YM-10(ミリポア)で濃縮し、0.02% Tween20及び0.15 M NaClを含む20 mM酢酸緩衝液、pH 6.0で平衡化したHiLoad 26/60 Superdex 200 pg column(アマシャムバイオサイエンス)に添加した。それぞれメインピークとして溶出した画分を精製画分とした(図16)。HL5はsc(Fv)<sub>2</sub>とほとんど同じ位置に溶出され、HL5のモノマーと考えられる分子は認められなかった。
- [0146] 精製した4種類のヒト化MABL-1抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>、ヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>は、Superdex 200 PC 3.2/30 column(アマシャムバイオサイエンス)を使用し分析ゲルろ過を行った。いずれもシングルピークで、ヒト化MABL-1抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>は見かけ上の分子量は約42 kDaを、ヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>は見かけ上の分子量約40 kDaを示した(図17)。以上のことから、ヒト化MABL-1,2抗体のHL5は一本鎖Fvの二分子からなるダイマーで、ヒト化MABL-1,2抗体sc(Fv)<sub>2</sub>は一本鎖Fvのモノマーであることが分かった。
- [0147] ヒト化MABL-1抗体HL5は還元と非還元条件SDS-PAGE分析の結果、両条件ともmonomerの分子量位置(約30 kDa)に単一のバンドを示した。ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)<sub>2</sub>は、還元と非還元の両条件でmonomerの分子量位置(約55 kDa)に単一のバンドを示した(図18)。ヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>についても還元と非還元条件SDS-PAGE分析の結果、ヒト化MABL-1抗体と全く同様の結果が得られた。(図19)。以上のことから、ヒト化MABL-1,2抗体HL5は分子間にはS-S架橋はなく、非共有結合性ダイマーを形成していることが分かった。

**実施例6:ヒト化MABL-1抗体HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>、ヒト化MABL-2抗体HL5及びsc(Fv)<sub>2</sub>のin vitroでのアポトーシス誘起効果**

ヒトCD47遺伝子を導入したL1210細胞、MOLT4細胞(ATCC)、JOK-1細胞(林原生物化学研究所 藤崎細胞センター)を用い、ヒト化MABL-1抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>、ヒト化MABL-2抗体HL5およびsc(Fv)<sub>2</sub>のアポトーシス誘起作用をAnnexin-V(ロシュ・

ダイアグノスティクス)染色により検討した。細胞 $1 \times 10^5$ 個に、各抗体を50 nmol/Lから10倍希釈ずつ0.005 nmol/Lまで、もしくは抗体の代わりにPBS(−)を添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V染色を行い、FACSCaribur装置(BECTON DICKINSON)にて蛍光強度を測定した。その結果、いずれの細胞においても細胞死を誘導した。

図20にMOLT4細胞における結果を示した。

#### 実施例7:ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2の白血病モデル動物での薬効試験

##### (1)ヒト白血病マウスモデルの作製

ヒト白血病マウスモデルは以下のように作製した。SCIDマウス(日本クレア)を用いてJOK-1細胞(林原生物化学研究所 藤崎細胞センター)をRPMI1640培地(GIBCO BRL社製)で $2.5 \times 10^7$ 個/mLになるように調製した。あらかじめ前日抗アシロGM1抗体(和光純薬社製、1バイアルを5mLで溶解)100 μLを皮下投与したSCIDマウス(オス、6週齢)(日本クレア)に上記JOK-1細胞懸濁液200 μL( $5 \times 10^6$ 個/マウス)を尾静脈より注入した。

##### [0148] (2)投与抗体の調製

ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2を投与当日、濾過滅菌したPBS(−)を用いて、1 mg/mL、になるように調製し、投与試料とした。

##### (3)抗体投与

(1)で作製したヒト白血病マウスモデルに対し、JOK-1細胞移植後3日目より、1日2回、5日間、上記(2)で調製した投与試料を10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照として、濾過滅菌したPBS(−)を同様に1日2回、5日間、10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。いずれの群も、1群7匹で行った。

##### (4)抗腫瘍効果の評価

ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2のヒト白血病マウスモデルにおける抗腫瘍効果については生存期間で評価した。その結果、図21に示すとおり、ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2投与群ではPBS(−)投与群と比較して生存期間の延長が認められた。

##### [0149] 以上より、ヒト化MABL-1抗体sc(Fv)2がヒト白血病マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。この抗腫瘍効果は、当該ヒト化抗体が有するアポトーシス誘起作用に基づくと考えられる。

### 実施例8:S-S結合導入ヒト化MABL-2 HL5の作製

#### (1)ヒト化MABL-2抗体HL5へのS-S結合配列導入

実施例4で構築したヒト化MABL-2抗体HL5の2ヶ所のアミノ酸をシステイン残基に変換し、DiabodyのS-S結合による安定化のための実験を行った(図22)。

- [0150] 以下に、(i)Cys44(VH) / Cys 100(VL)、(ii)Cys 105(VH) / Cys 43(VL)の組み合わせでの2種のS-S体構築のためのプライマー配列を示す。

Ctcgaggaattcccaccatggatggagctgtatcatcc 5F44-100(共通)(配列番号80)

Ggggcctgtcgccaggtaataac 5R44-100(配列番号81)

Gggcagtcagtgtatacggccgtgcgtcagatctgagactgctc 5R105-43(配列番号82)

Gggcaatgccttgagtggatggataatattatcc 3F44-100(配列番号83)

Tcattatttgcgtcaagttggcccgccaaacgtgtacggaaacatgtgt 3R44-100(配列番号84)

Tactatttgcttagaggggttactatacttacgacgactggggctgcgcacaccctggcacagtctc MF105-43  
(配列番号85)

Gggcttctgcagatccaaatgtaaataggctttc MR105-43(配列番号86)

Gggcagtgcctaagactcctgatctacaagttcc 3F105-43(配列番号87)

Tcattatttgcgtcaagttggcccgccaaac 3R105-43(配列番号88)

PCR反応はKODポリメラーゼ(東洋紡)、鑄型とし pCHOHuM2Db を用い、94℃、1分の変性後、98℃ 30秒、65℃ 2秒、74℃ 30秒を30サイクル行った。

(i)Cys44(VH) / Cys 100(VL)用の変異の導入は、5F44-100 / 5R44-100、3F44-100 / 3R44-100のプライマーの組み合わせでPCR反応を行い、pBluescriptSK+(Stratagene社)のSmaI部位に3'側断片、5'断片の順にRapid DNA ligation kit (Roche社)を用いて逐次連結した。

(ii)Cys 105(VH) / Cys 43(VL)用の変異の導入は、5F44-100 / 5R105-43、MF105-43 / MR105-43、3F105-43 / 3R105-43のプライマーの組み合わせでPCRを行い、5F44-100 / 5R105-43、3F105-43 / 3R105-43で得たPCR断片をpBluescriptSK+のSmaI部位に逐次連結し、その後5R105-43およびMF105-43に予め保存的変異を導入してデザインしたBsT107I部位とSmaI部位を利用してMF105-43 / MR105-43断片を連結して得た。構築したそれぞれのプラスミドを大腸菌DH5a株(東

洋紡社)に導入し、得られた組換え大腸菌からプラスミドを精製(QIAGEN社)し、ABI3100 Genetic Analyzerで解析を行った。

- [0151] 得られたCys44(VH) / Cys 100(VL)およびCys 105(VH) / Cys 43(VL)は、以下、ヒト化MABL-2 HL5 SS44およびMABL-2 HL5 SS105と呼ぶものとする。なお、MABL-2 HL5 SS44の塩基配列とアミノ酸配列をそれぞれ配列番号89と配列番号90に、MABL-2 HL5 SS105の塩基配列とアミノ酸配列をそれぞれ配列番号91と配列番号92に示す。
- [0152] 動物細胞発現用に、SS44およびSS105の遺伝子をpBluescriptSK+よりBamHI、XhoIで切り出し、発現ベクターpcDNA3.1(Hygro-)(Invitrogen社)の同部位に連結した。これらをphMABL2(SS44)およびphMABL2(SS105)と呼ぶものとする。
- [0153] (2) CHO(DXB11)細胞を用いたS-S結合導入ヒト化MABL-2 HL5の生産細胞の作製  
phMABL2(SS44)およびphMABL2(SS105)のそれぞれ10mgを $4 \times 10^6$ 細胞のCHO細胞(DXB11)へとエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)]により導入した。導入後細胞は50 mLのaMEM-FBSに懸濁し、95ウェルプレート(Corning社)5枚にウェルあたり100 mLずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37°C、24時間培養した後、培地を100mg/mLのHygromycinBを含むaMEM-FBSに代え、さらにHygromycinB濃度を段階的に200 mg/mL、400mg/mLに上げ、選抜を行った。
- [0154] 得られた耐性株はさらにDHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的でMTX(SIGMA社製)を10 nM MTX、400 mg/mL HygromycinB含むaMEM-FBSで2週間培養を行い、10 nM MTX耐性を示す形質転換体を得た。増殖が認められたウェルの形質転換株は、さらにMTX濃度を50 nM、100 nM、200 nMに上げ、最終的に400 mg/mLのHygromycinB、200 nMのMTXを含むaMEM-FBS培地中で培養した。結合標的とする可溶型ヒトCD47をBIACOREセンサーチップCM5(Biacore AB)にアミンカップリング法で固定化し、選択培養により得られたクローンから回収した培養上清をこのセンサーチップへ注入した。このときの抗体結合量から発現濃度を定量し、高発現のクローンをヒト化MABL-2 HL5 SS44およびSS105の産

生細胞株として選択した。

[0155] 3) S-S結合導入ヒト化MABL-2 HL5の生産細胞の培養

上記(2)で得られたヒト化MABL-2 HL5 SS44およびSS105の產生細胞株を100 nM MTX、400 mg/mL Hygromycin Bを含む無血清培地CHO-S-SFII(GIBCO BRL社製)で100 mLのスピナーフラスコで2週間培養し、馴化を行った。馴化した細胞は拡大培養のため、1 L(培地量700 mL)、または8 Lスピナーフラスコ(培地量6L)にそれぞれ $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ の細胞を巻き込み、3または7日間培養して、培養上清を回収した。

[0156] (4) S-S結合導入ヒト化MABL-2 HL5の精製

上記(3)で得られた培養上清から、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの3つの工程によりヒト化MABL-2HL5のSS44及びSS105精製(2種類)を行った。いずれの2種類の抗体も全く同じ方法で精製をしたが、精製結果に違いはほとんど見られなかったため、区別せずに記述した。

[0157] 培養上清は、0.02% Tween20を含む20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5で2倍に希釈した後、1 M酢酸でpHを5.5に調整した。この後、0.02% Tween20を含む20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5で平衡化したSP Sepharose Fast Flow column(アマシヤムバイオサイエンス)にかけ、同緩衝液でカラムを洗浄後、同緩衝液中0 Mから0.6 MまでのNaClの直線濃度勾配で、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し、ヒト化MABL-2HL5のSS44及びSS105を含む画分を集めた。

[0158] 第一工程で得られたヒト化MABL-2HL5のSS44およびSS105は、0.1 M NaOHによりpH 6.0～6.5の範囲内に調整した後、それぞれ0.02% Tween20を含む10 mMリン酸緩衝液、pH 7.0で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(BIO-RAD、タイプI、20 mm)に添加し、同緩衝液でカラムを洗浄後、リン酸緩衝液濃度を200 mMまで直線的に上げ、カラムに吸着したポリペプチドを溶出した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し、目的のポリペプチドが含まれる画分が含まれる画分を集めた。

[0159] 第二工程で得られた各画分をそれぞれCentricon YM-10(ミリポア)で濃縮し、0.02%

Tween20及び0.15 M NaClを含む20 mM酢酸緩衝液、pH 6.0で平衡化したpH 6.0で平衡化したHiLoad 16/60 Superdex 200 pg column(アマシャムバイオサイエンス)に添加した。得られた画分をSDS-PAGEで分析し目的のポリペプチドが含まれるメインピークを精製画分とした。

- [0160] 精製した2種類のヒト化MABL-2HL5のSS44およびSS105は、Superdex 200 PC 3.2/30 column(アマシャムバイオサイエンス)を使用し分析ゲルろ過を行った。いずれもシングルピークで、見かけ上の分子量約40 kDaを示した(図23)。
- [0161] ヒト化MABL-2HL5のSS44およびSS105は還元と非還元条件SDS-PAGE分析の結果、還元条件ではmonomerの分子量位置(約26 kDa)に単一のバンドを示し、非還元条件ではdimerの分子量位置(約45 kDa)に単一のバンドを示した(図24)。以上のことから、ヒト化MABL-2HL5のSS44およびSS105は一本鎖Fvの2分子がS-S架橋で結合したダイマーであることが分かった。

実施例9:S-S結合導入ヒト化MABL-2抗体HL5のin vitro でのアポトーシス誘起効果

ヒトCD47遺伝子を導入したL1210細胞、JOK-1細胞(林原生物化学研究所 藤崎細胞センター)を用い、S-S結合導入ヒト化MABL-2抗体HL5のアポトーシス誘起作用をAnnexin-V(ロシュ・ダイアグノスティクス)染色により検討した。細胞 $1 \times 10^5$ 個に、各抗体を50 nmol/Lから10倍希釈ずつ0.005 nmol/Lまで、もしくは抗体の代わりにPBS(-)を添加し、24時間培養した。その後、Annexin-V染色を行い、FACSCaribur装置(BECTON DICKINSON)にて蛍光強度を測定した。その結果、いずれの細胞にも細胞死を誘導した。図25にヒト化MABL-2 HL5 SS44のヒトCD47遺伝子を導入したL1210細胞に対するアポトーシス誘導効果の結果を示した。

## 請求の範囲

- [1] CD47に結合するヒト化抗体。
- [2] CD47がヒトCD47である請求項1に記載のヒト化抗体。
- [3] ヒト化抗体のCDRがマウス抗体由来である請求項1または2に記載のヒト化抗体。
- [4] 以下の配列のいずれかを含む請求項1～3のいずれかに記載のヒト化抗体：
  - (1)配列番号7のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (2)配列番号10のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (3)配列番号13のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (4)配列番号16のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (5)配列番号19のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (6)配列番号22のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (7)配列番号30のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (8)配列番号37のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (9)配列番号40のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (10)配列番号43のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (11)配列番号46のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (12)配列番号49のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(13)配列番号52のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(14)配列番号57のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

(15)配列番号64のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)

(16)配列番号67のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)。

[5] 以下の配列のいずれかを含む請求項1～3のいずれかに記載のヒト化抗体：

(1)配列番号7のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(2)配列番号10のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(3)配列番号13のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(4)配列番号16のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(5)配列番号19のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(6)配列番号22のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(7)配列番号30のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(8)配列番号37のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(9)配列番号40のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(10)配列番号43のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(11)配列番号46のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(12)配列番号49のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(13)配列番号52のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(14)配列番号57のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)

(15)配列番号64のアミノ酸番号1～30の配列(FR1)、アミノ酸番号36～49の配列(FR2)、アミノ酸番号67～98の配列(FR3)、アミノ酸番号107～117の配列(FR4)

(16)配列番号67のアミノ酸番号1～23の配列(FR1)、アミノ酸番号40～54の配列(FR2)、アミノ酸番号62～93の配列(FR3)、アミノ酸番号103～112の配列(FR4)。

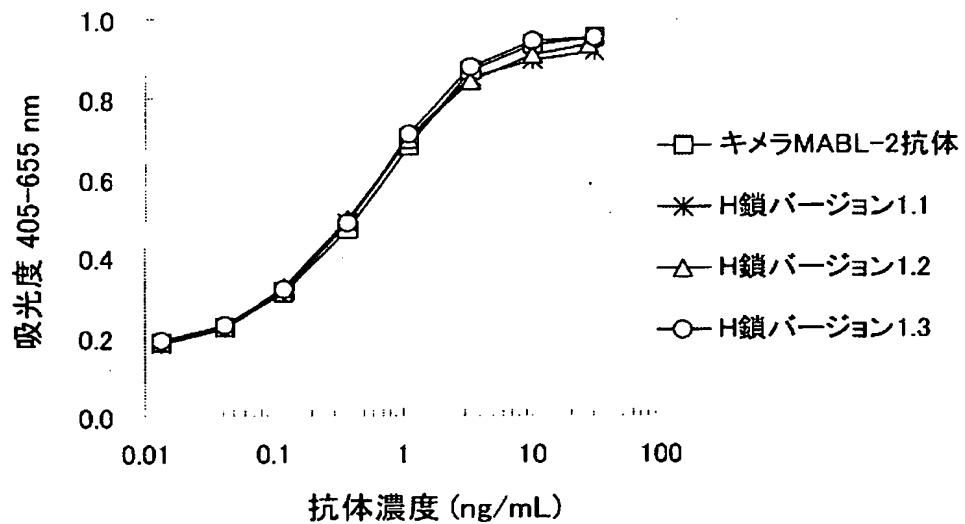
- [6] 低分子化抗体である請求項1～5のいずれかに記載のヒト化抗体。
- [7] ダイアボディ(Diobody)である請求項6記載のヒト化抗体。
- [8] 一本鎖Diobodyである請求項7記載のヒト化抗体。
- [9] Diobodyを構成するフラグメント間にジスルフィド結合が存在することを特徴とする請求項7または8に記載のヒト化抗体。
- [10] 以下の特徴を有する請求項9記載のヒト化抗体:
  - (1)配列番号90に記載のアミノ酸配列を有する抗体;又は
  - (2)アミノ酸配列(1)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換したアミノ酸配列を有し、かつCD47への結合活性を有する抗体。
- [11] 以下の特徴を有する請求項9記載のヒト化抗体:
  - (1)配列番号92に記載のアミノ酸配列を有する抗体;又は
  - (2)アミノ酸配列(1)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加又は置換したアミノ酸配列を有し、かつCD47への結合活性を有する抗体。
- [12] Diobodyを構成するフラグメント間にジスルフィド結合が存在することを特徴とする、ヒト

CD47に結合するDiabody抗体。

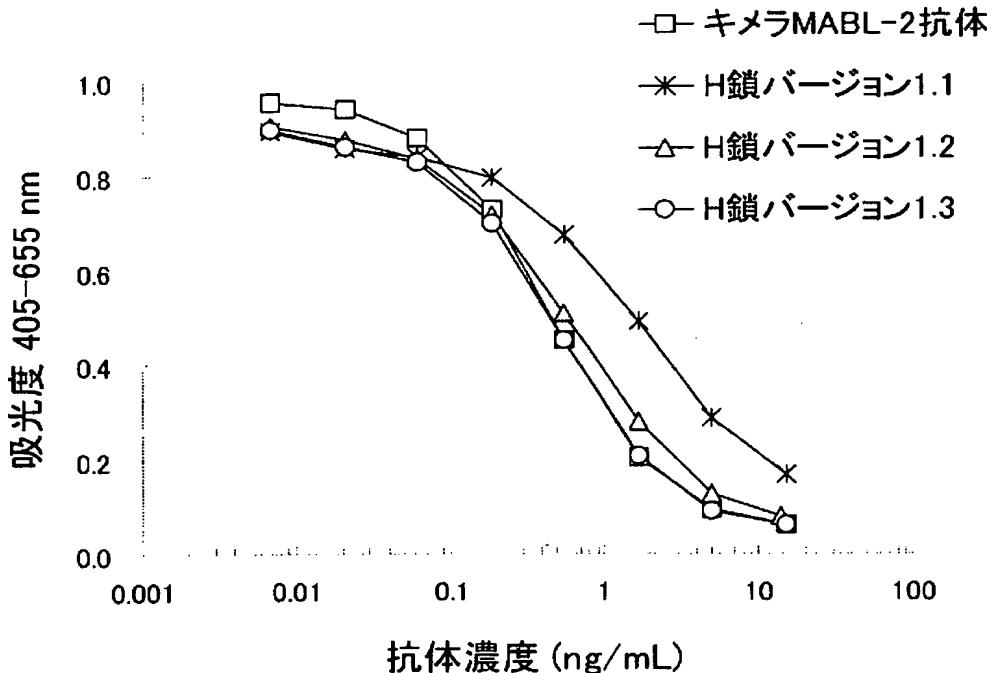
- [13] 以下の配列のいずれかを含む請求項12に記載のDiabody抗体：
- (1)配列番号7のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (2)配列番号10のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (3)配列番号13のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (4)配列番号16のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (5)配列番号19のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (6)配列番号22のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (7)配列番号30のアミノ酸番号31～35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50～66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99～106の配列(CDR3)
  - (8)配列番号37のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (9)配列番号40のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (10)配列番号43のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (11)配列番号46のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (12)配列番号49のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)
  - (13)配列番号52のアミノ酸番号24～39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55～61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94～102の配列(CDR3)

- (14)配列番号57のアミノ酸番号24ー39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55ー61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94ー102の配列(CDR3)
- (15)配列番号64のアミノ酸番号31ー35の配列(CDR1)、アミノ酸番号50ー66の配列(CDR2)、アミノ酸番号99ー106の配列(CDR3)
- (16)配列番号67のアミノ酸番号24ー39の配列(CDR1)、アミノ酸番号55ー61の配列(CDR2)、アミノ酸番号94ー102の配列(CDR3)。
- [14] 以下の配列を含むCD47に結合するヒト化抗体:
- (1)配列番号30のアミノ酸番号1ー117の配列の配列を含むH鎖V領域:及び
  - (2)配列番号57のアミノ酸番号1ー112の配列の配列を含むL鎖V領域。
- [15] 以下の配列を含むCD47に結合するヒト化抗体:
- (1)配列番号64のアミノ酸番号1ー117の配列を含むH鎖V領域:及び
  - (2)配列番号67のアミノ酸番号1ー112の配列を含むL鎖V領域。
- [16] 以下のいずれかの配列を含むCD47に結合する抗体:
- (1)配列番号73のアミノ酸番号1ー234の配列
  - (2)配列番号74のアミノ酸番号1ー234の配列
  - (3)配列番号78のアミノ酸番号1ー483の配列
  - (4)配列番号79のアミノ酸番号1ー483の配列。
- [17] 請求項1ー16のいずれかに記載の抗体をコードする遺伝子。
- [18] 請求項17に記載の遺伝子を含むベクター。
- [19] 請求項18に記載のベクターを含む宿主細胞。
- [20] 請求項19に記載の宿主細胞を培養する工程を含む抗体の製造方法。
- [21] 請求項1ー16のいずれかに記載の抗体を含む血液疾患治療薬。
- [22] 血液疾患が急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、成人T細胞白血病、多発性骨髓腫、Mixed Leukemia、Hairy cell Leukemia等の白血病、悪性リンパ腫(Hodgkin病、非Hodgkinリンパ腫)、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群、及び真性多血症から選択される請求項21記載の治療薬。

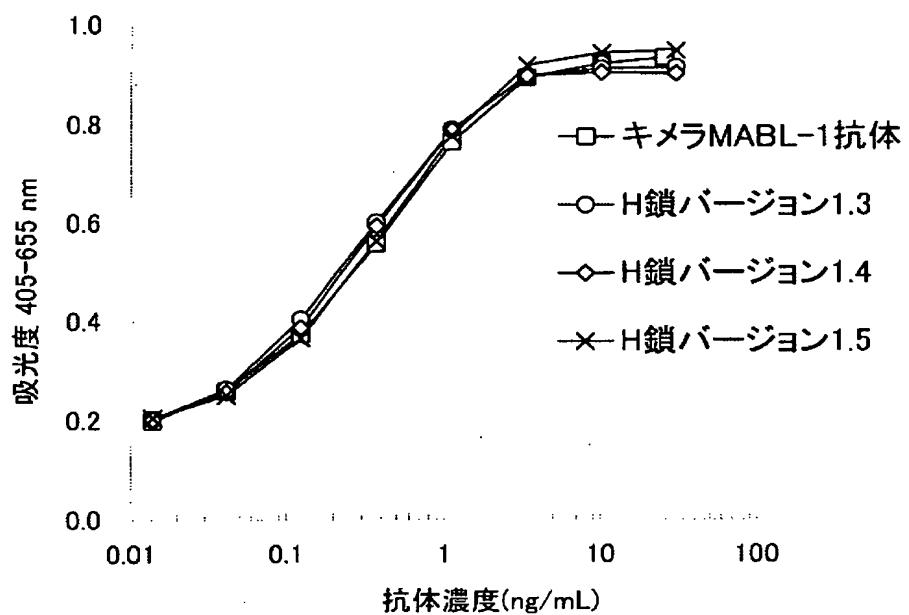
[図1]



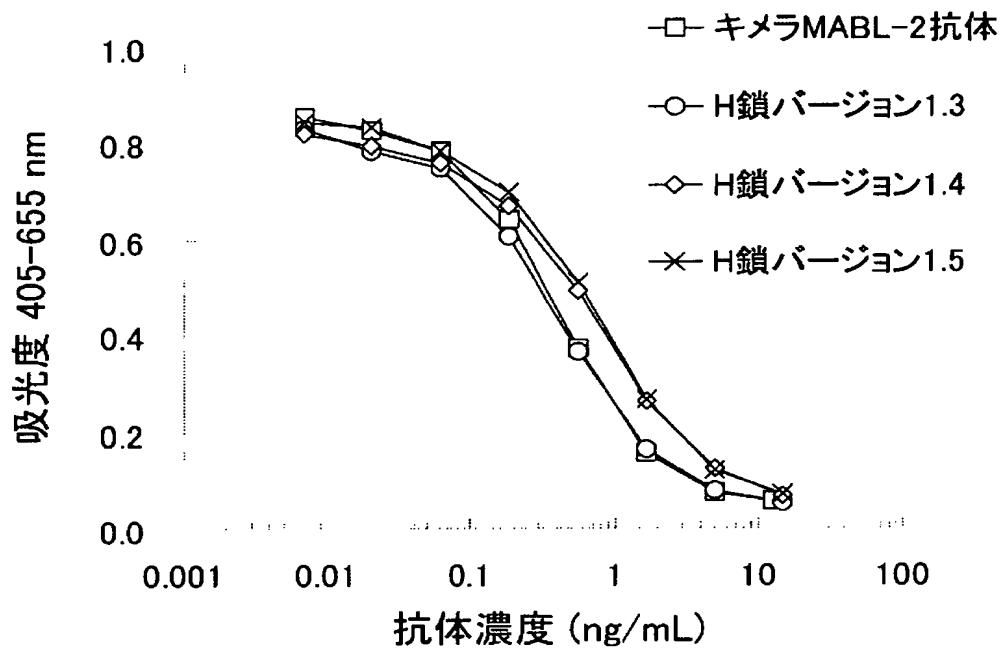
[図2]



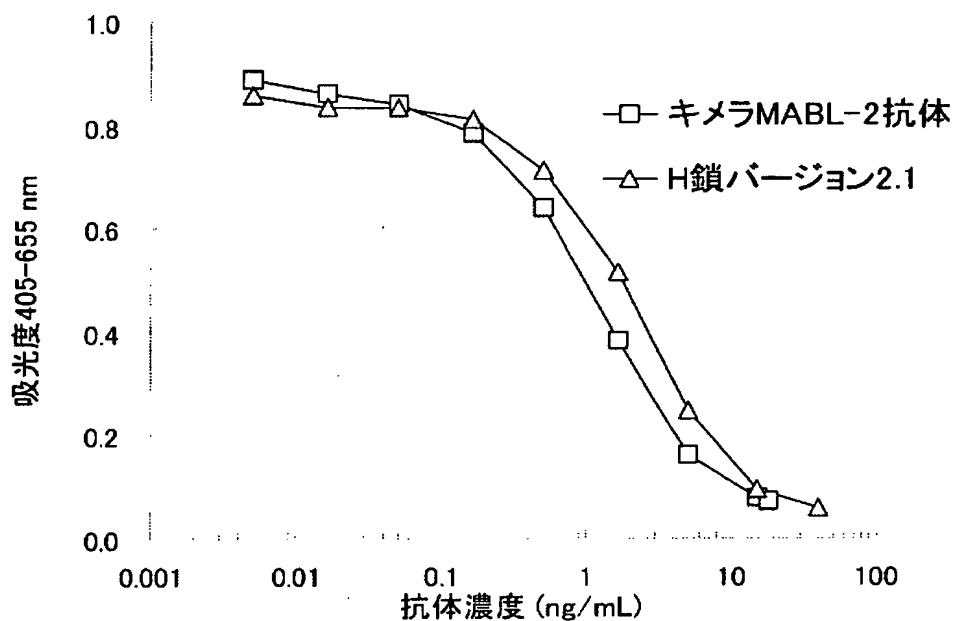
[図3]



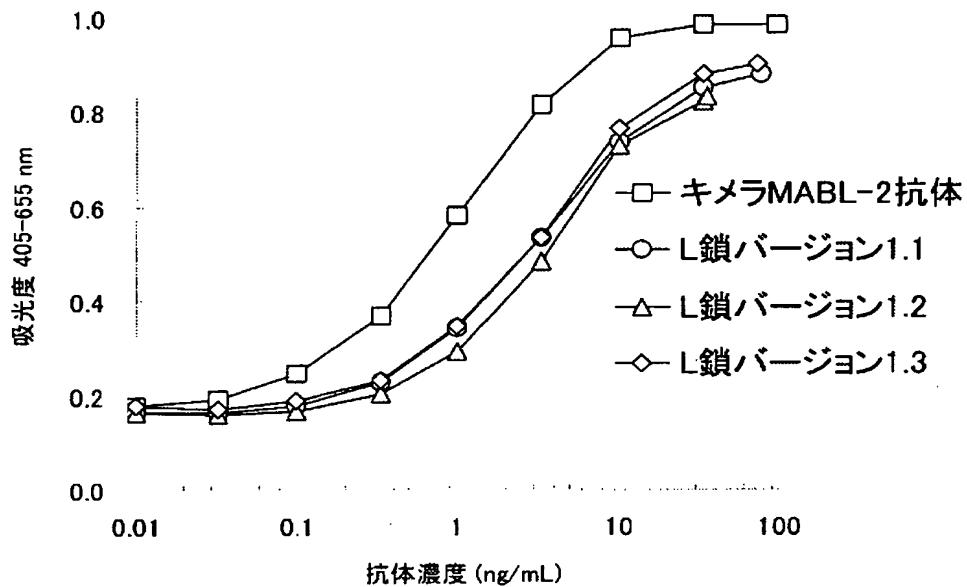
[図4]



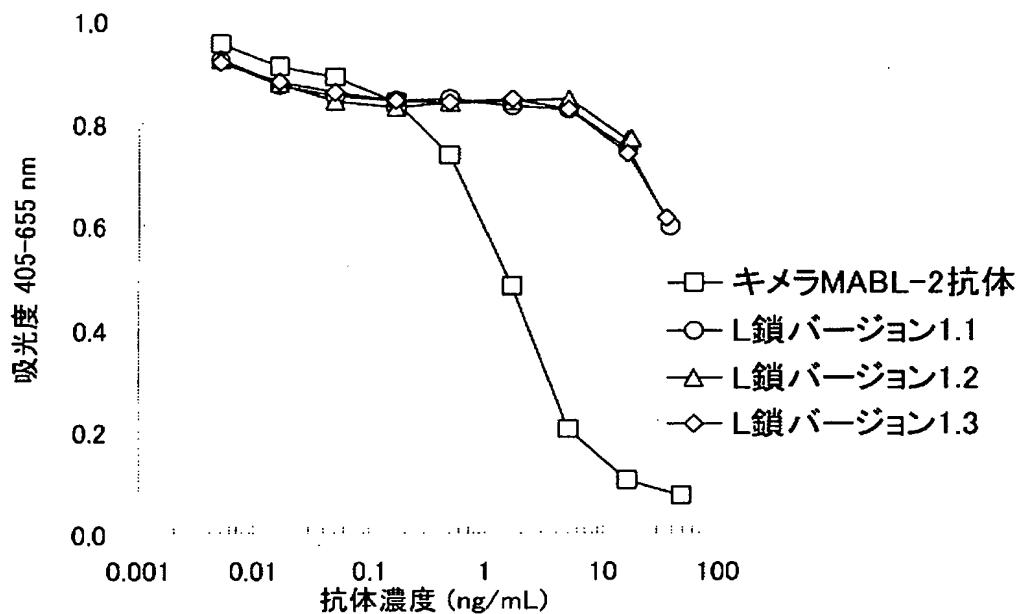
[図5]



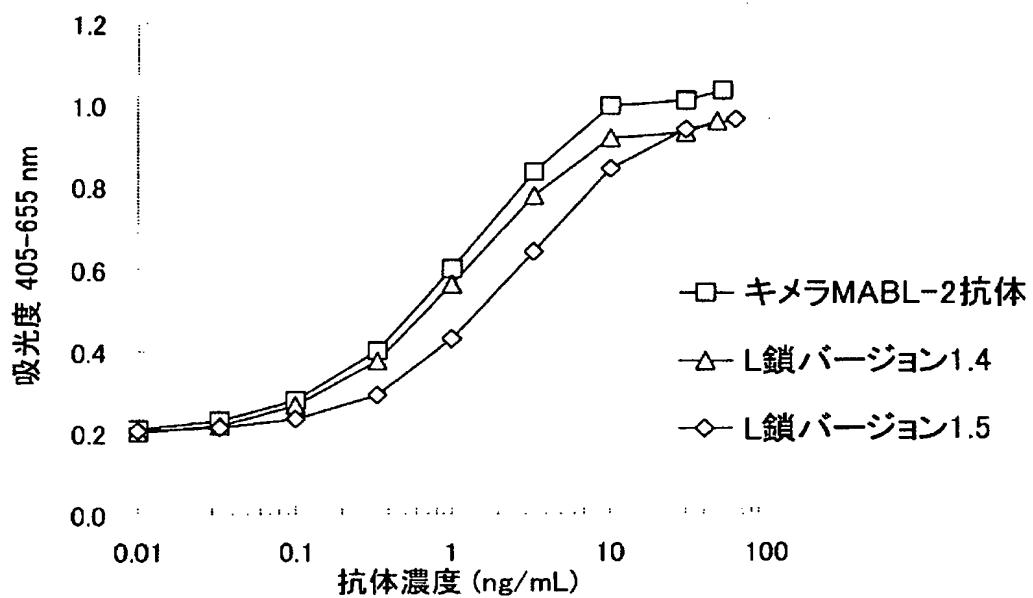
[図6]



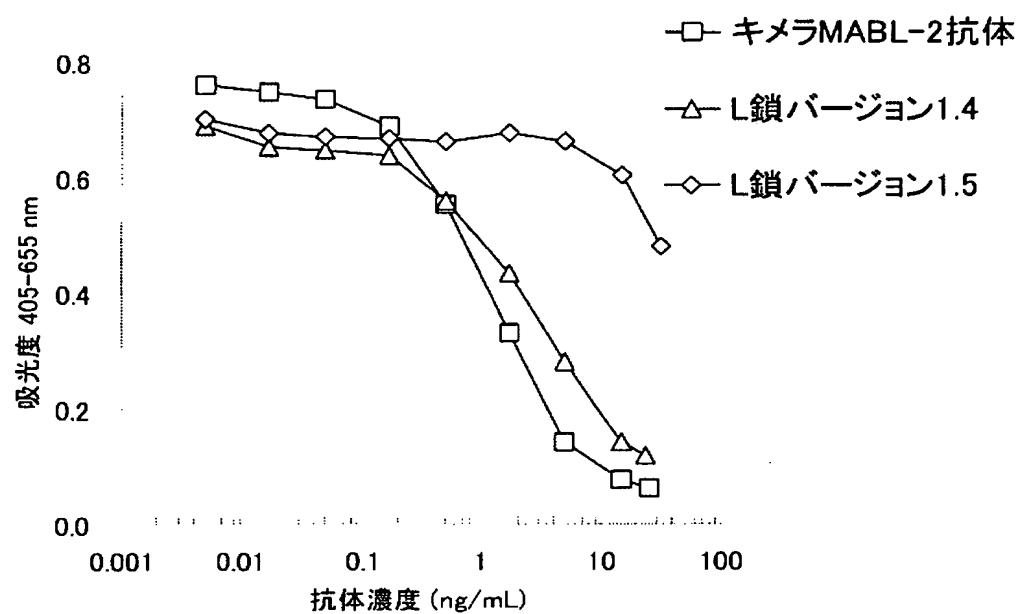
[図7]



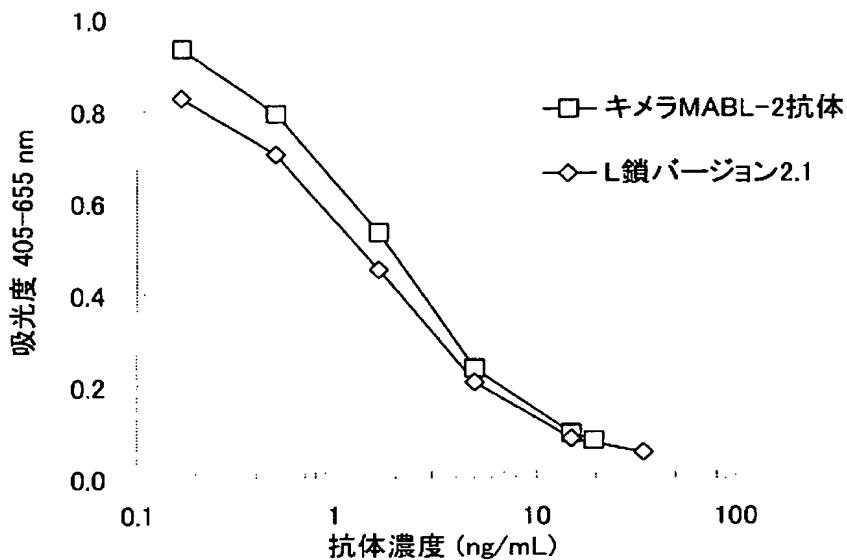
[図8]



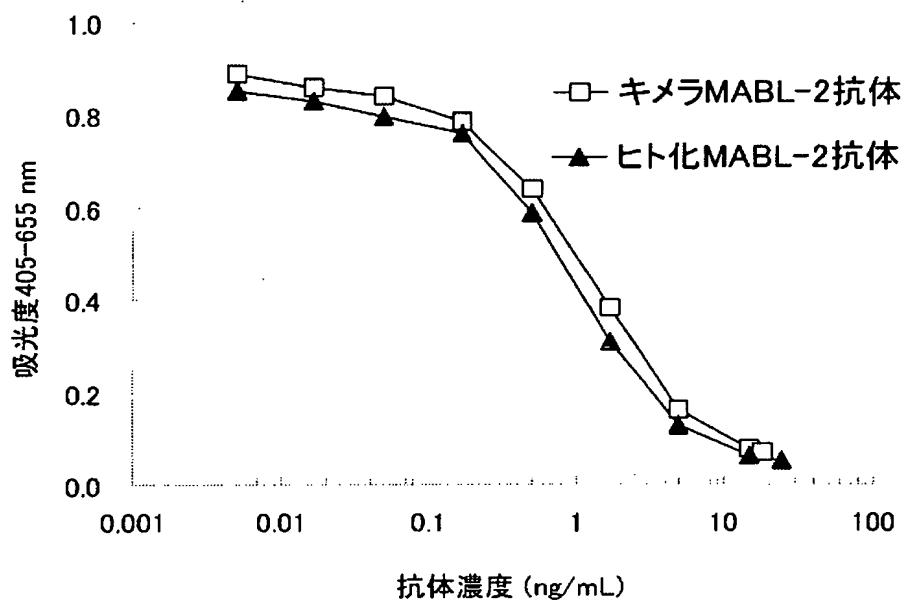
[図9]



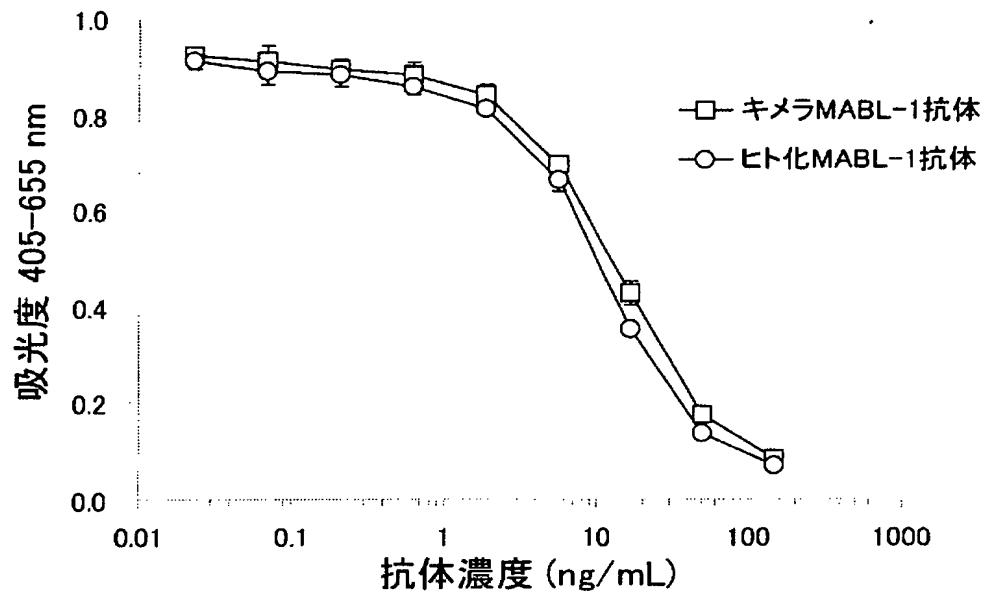
[図10]



[図11]

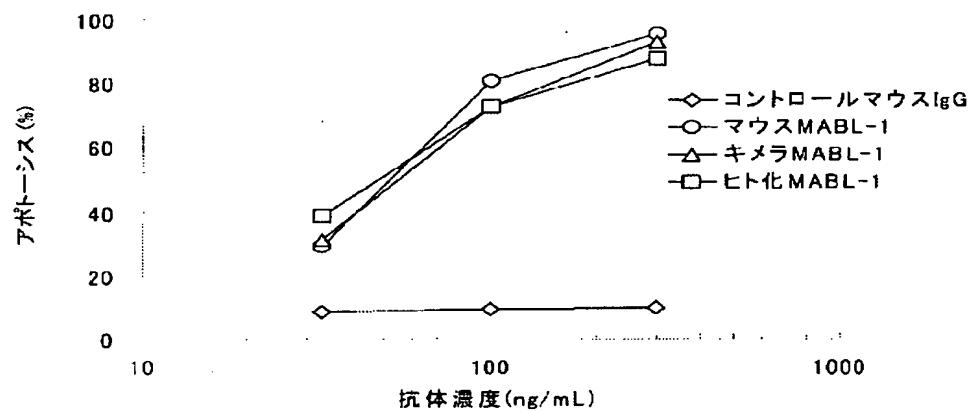


[図12]

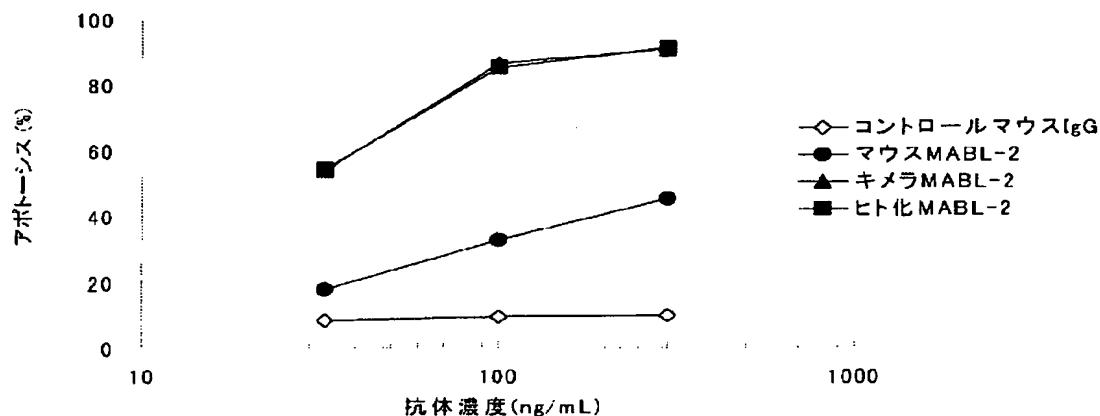


[図13]

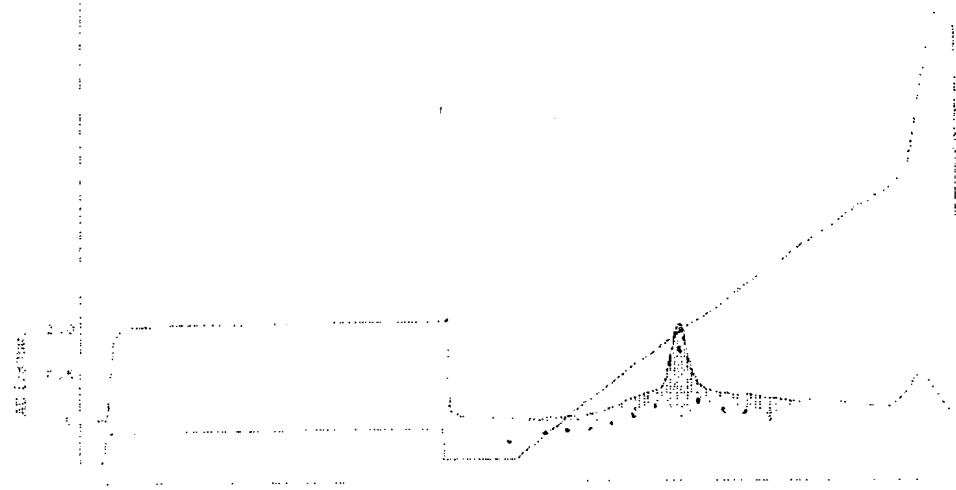
A



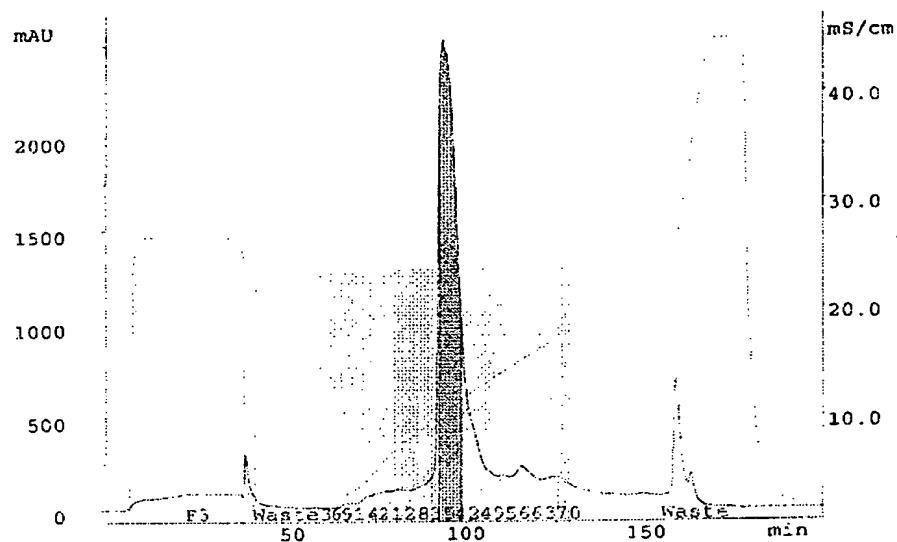
B



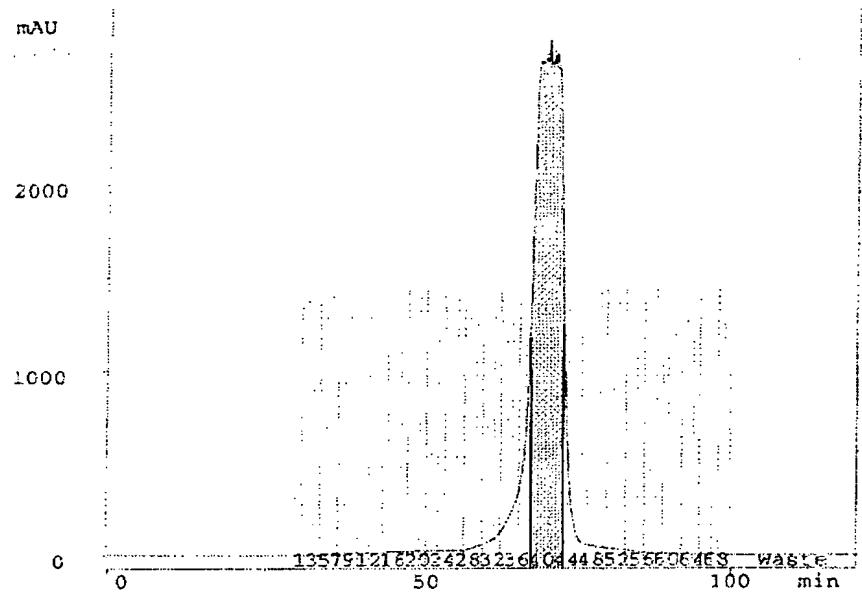
[図14]



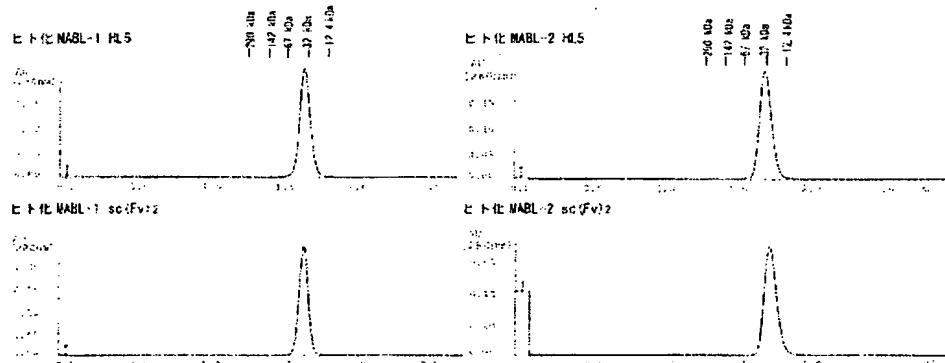
[図15]



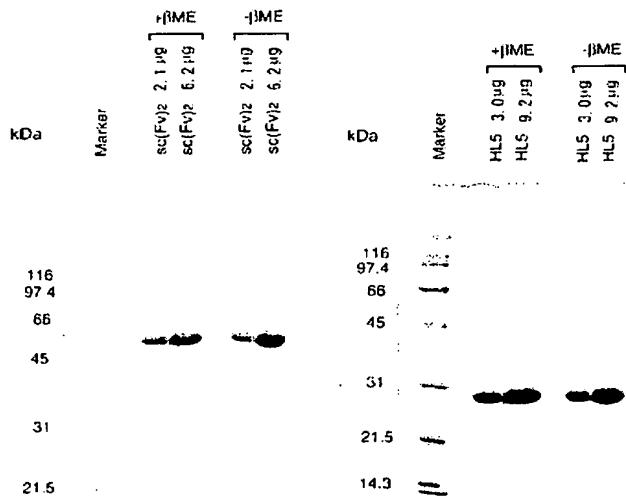
[図16]



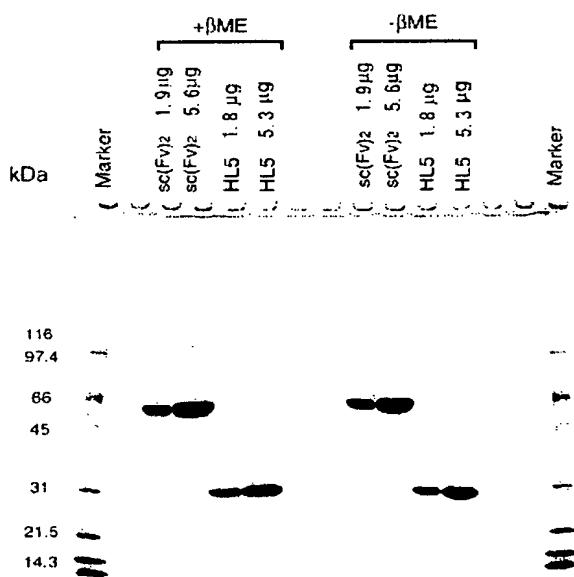
[図17]



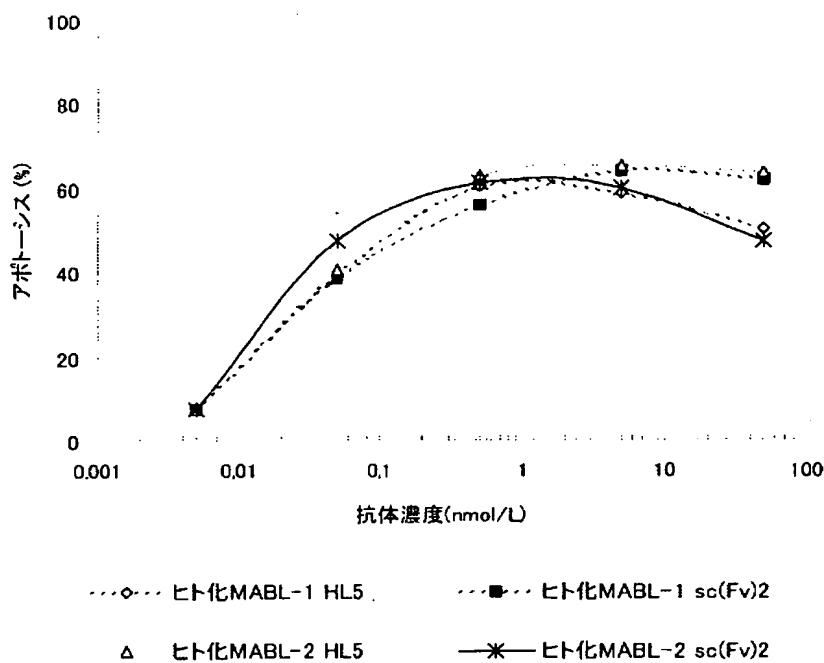
[図18]



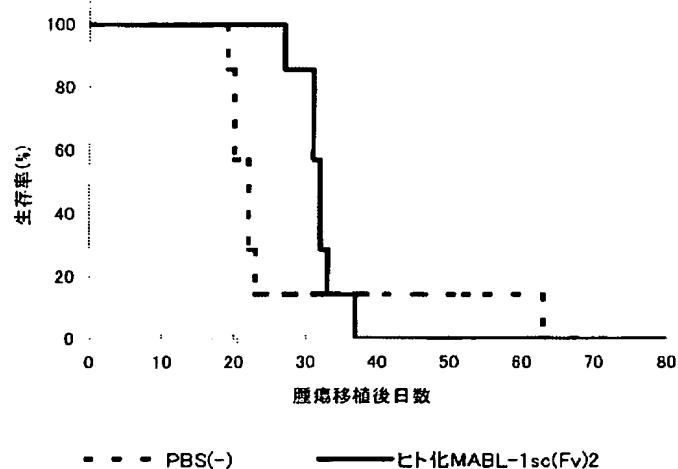
[図19]



[図20]



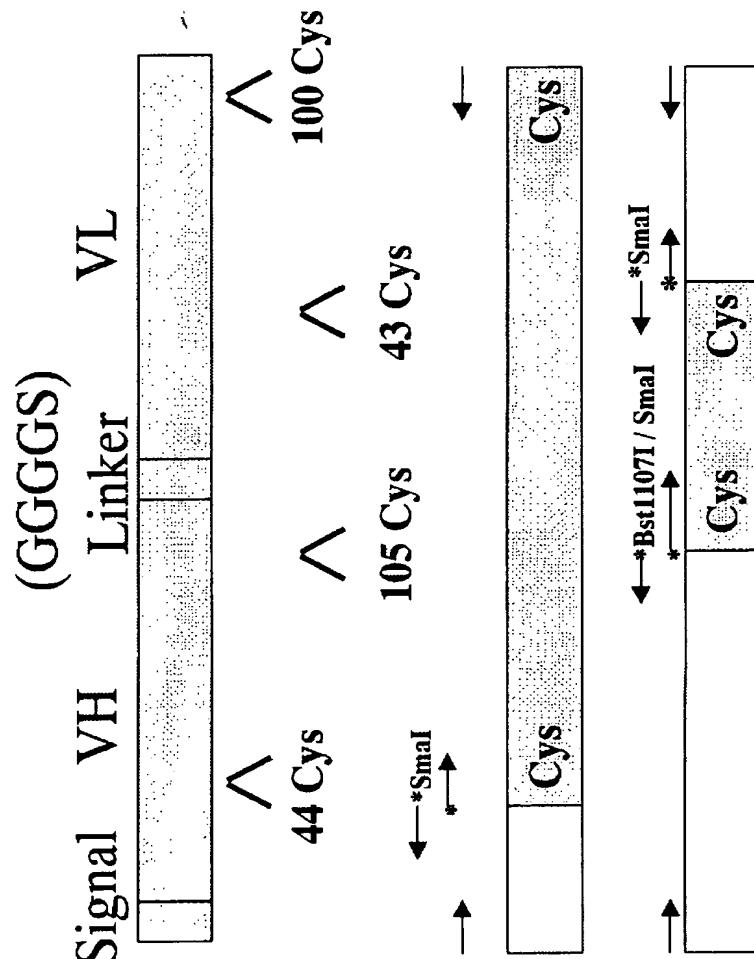
[図21]



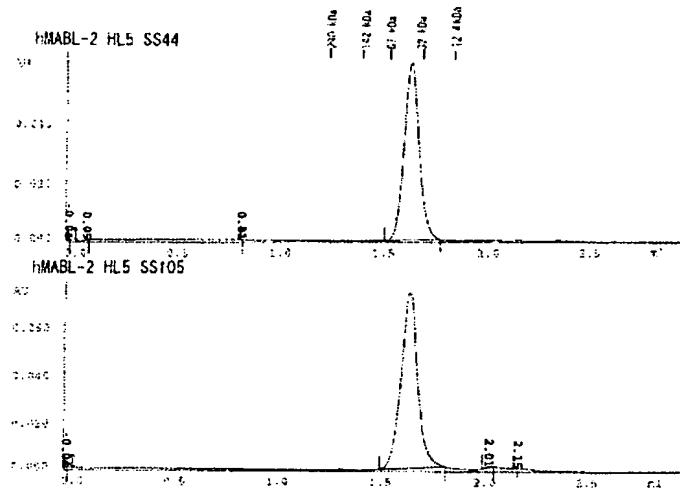
[図22]

**Cys 残基導入部位**

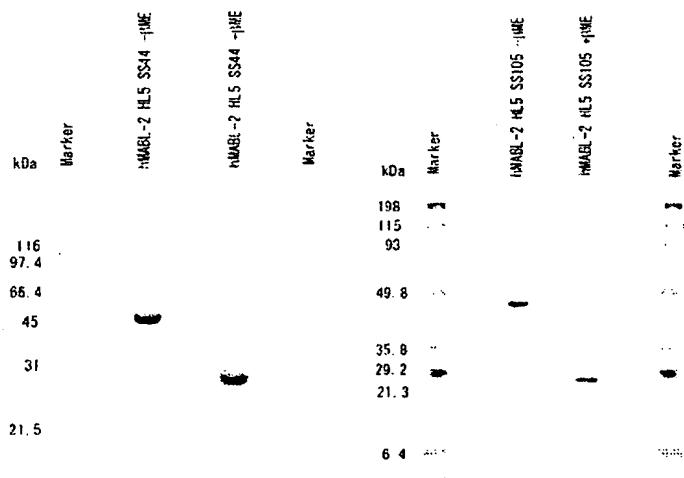
VH鎖44 Gly→Cys / VL鎖100 Gln→Cys  
 VH鎖105 Gln→Cys / VL鎖43 Ser→Cys



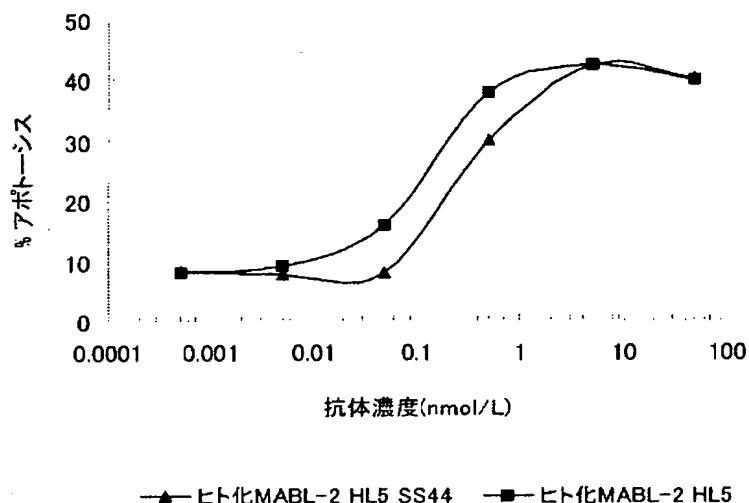
[図23]



[図24]



[図25]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016744

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/18, C07K19/00, C12P21/08, C12N15/13, A61K39/395,  
A61P35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/18, C07K19/00, C12P21/08, C12N15/13, A61K39/395,  
A61P35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN), JSTPLUS (JICST)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/12973 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 March, 1999 (18.03.99), & JP 11-155569 A & EP 1035132 A1 & US 2003/0157100 A1 & US 2003/0211108 A1	1-22
Y	JP 4-502408 A (Protein Design Labs Inc.), 07 May, 1992 (07.05.92), & WO 90/07861 A1 & EP 451216 A1 & EP 682040 A1 & US 5693761 A & JP 11-4694 A & EP 939127 A2 & JP 2003-245090 A & JP 2003-245091 A & EP 1477497 A1 & EP 1491556 A1	1-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 January, 2005 (17.01.05)

Date of mailing of the international search report  
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016744

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-217799 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 August, 1996 (27.08.96), & WO 96/02576 A1 & EP 770628 A1 & US 5994524 A & US 6024956 A & US 5048972 A & US 6068840 A & US 6245894 B & US 2002-0082396 A1	1-22
Y	JP 11-92500 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 April, 1999 (06.04.99), & WO 98/13388 A1 & EP 962467 A1 & JP 2003-174893 A	1-22
P, Y	Yasufumi KIKUCHI et al., "CD47 Kogen to Tokuiteki ni Ketsugo shi Hakketsubyo Saibo ni Apoptosis o Yudo suru Diabody no Kochiku", Dai 26 Kai The Molecular Biology Society of Japan Nenkai Program Koen Yoshishu, 25 November, 2003 (25.11.03), page 660, 1PC-166	1-22

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07K16/18, C07K19/00, C12P21/08, C12N15/13, A61K39/395, A61P35/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C07K16/18, C07K19/00, C12P21/08, C12N15/13, A61K39/395, A61P35/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA(STN)  
JSTPLUS(JICST)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/12973 A1 (中外製薬株式会社) 1999.03.18 & JP 11-155569 A & EP 1035132 A1 & US 2003/0157100 A1 & US 2003/0211108 A1	1-22
Y	JP 4-502408 A (プロテイン デザイン ラブス, インコーポレー ティド) 1992.05.07 & WO 90/07861 A1 & EP 451216 A1 & EP 682040 A1 & US 5693761 A & JP 11-4694 A & EP 939127 A2 & JP 2003-245090 A & JP 2003-245091 A & EP 1477497 A1 & EP 1491556 A1	1-22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17.01.2005	国際調査報告の発送日 01.2.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9548

C(続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 8-217799 A (中外製薬株式会社) 1996.08.27 & WO 96/02576 A1 & EP 770628 A1 & US 5994524 A & US 6024956 A & US 5048972 A & US 6068840 A & US 6245894 B & US 2002-0082396 A1	1-22
Y	JP 11-92500 A (中外製薬株式会社) 1999.04.06 & WO 98/13388 A1 & EP 962467 A1 & JP 2003-174893 A	1-22
P Y	菊地康文他, CD47抗原と特異的に結合し白血病細胞にアポトーシスを誘導するDiabodyの構築, 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2003.11.25, p.660 1PC-166	1-22

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**